

Synthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen neuer Purinrezeptor-Liganden

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kirsten Ritter (geb. Loos)

aus

Hachenburg

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Referent: Prof. Dr. Evi Kostenis

Tag der Promotion: 26.11.2012

Erscheinungsjahr: 2013

IN DER DISSERTATION EINGEBUNDEN:

Zusammenfassung

Meiner Familie

“Was man will, das muss man tun!”

INHALTSVERZEICHNIS

1	REZEPTOREN	1
1.1	Einteilung der Rezeptoren.....	1
1.2	Aufbau und Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	2
1.3	Purinerge Rezeptoren	6
1.3.1	Der Adenosin-A ₁ -Rezeptor.....	9
1.3.2	Adenosin-A ₁ -Rezeptor-Agonisten.....	11
1.3.3	Adenosin-A ₁ -Rezeptor-Antagonisten	12
1.3.4	Der A ₁ -Rezeptor als therapeutische Zielstruktur	14
1.4	Waisen-Rezeptoren.....	20
1.5	Der GPR17.....	22
1.5.1	Definition und Entdeckung	22
1.5.2	Aufbau des GPR17 und Bindung von Liganden	22
1.5.3	Expression.....	27
1.5.4	Pharmakologie.....	28
2	ZIEL DER ARBEIT	33
3	SYNTHESE VON A₁-AGONISTEN FÜR DEN EINSATZ IN DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE (PET)	35
3.1	Die Positronen-Emissions-Tomographie.....	35
3.2	Radionuclide für die PET-Technik	36
3.3	Strategien der ¹⁸ F-Radiomarkierung.....	38
3.4	Voraussetzungen für PET-Tracer	40
3.5	PET/CT-Technik	41
3.6	Klinischer Einsatz der Positronen-Emissions-Tomographie.....	42
3.7	Übersicht über bekannte PET-Liganden zur Untersuchung von P1-Rezeptoren	43
3.7.1	Antagonistische PET-Liganden für den A ₁ -Adenosin-Rezeptor	43

3.7.2	Antagonistische PET-Liganden für den A _{2A} -Rezeptor	44
3.7.3	Antagonistische PET-Liganden für den A ₃ -Rezeptor	47
3.8	Synthese von <i>N</i>⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin	48
3.8.1	Einleitung	48
3.8.2	Synthese	50
3.9	Synthese von 5'-Chlor-5'-desoxy-<i>N</i>⁶-((1<i>S</i>,2<i>S</i>)-2-fluor)cyclopentyladenosin und 5'-Fluor-5'-desoxy-<i>N</i>⁶-((1<i>S</i>,2<i>S</i>)-2-fluor)cyclopentyladenosin	67
3.9.1	Einleitung	67
3.9.2	Synthese	70
4	INDOL-DERIVATE ALS AGONISTEN FÜR DEN WAISENREZEPTOR „GPR17“ ..	107
4.1	Allgemeine Synthese der Indol-Leitstruktur	109
4.2	Übersicht über bereits existierende Indol-Derivate	113
4.3	Synthese neuer Indol-Derivate	118
4.3.1	Variation des Phenyl-Substitutionsmusters	118
4.3.2	Indolsynthesen in der Mikrowelle	134
4.3.3	Untersuchungen am Pyrrolring des Indols	136
4.4	Struktur-Wirkungsbeziehungen	149
4.5	Synthese von Purin-Analoga	151
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	161
6	EXPERIMENTELLER TEIL	165
6.1	Allgemeine Angaben	165
6.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	165
6.1.2	Dünnschichtchromatographie	165
6.1.3	Säulenchromatographie	165
6.1.4	Geräte	165
6.2	IUPAC-Zählweise für Indol-Derivate	167

6.3	IUPAC-Zählweise für Nucleosid-Derivate.....	168
6.4	Projekt 1: Synthese von N^6-substituierten Adenosin-Derivaten als Liganden für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	168
6.4.1	Einführung der Inosin-Ribose-Schutzgruppen	168
6.4.2	Chlorierung	171
6.4.3	Aminierung	174
6.4.4	Chlorierung der 5'-Position mit gleichzeitiger Schützung der 2',3'-Hydroxygruppen	177
6.4.5	Abspaltung der 2',3'-O-Sulfinyl-Schutzgruppe	178
6.4.6	Schutz der 2',3'-Hydroxygruppen	179
6.4.7	Katalytische Hydrierung.....	188
6.4.8	Einführung der Abgangsgruppe.....	191
6.4.9	Fluorierung	196
6.4.10	Abspaltung der 2',3'-p-Methoxybenzyliden- (Anisyliden-) Schutzgruppe	200
6.5	Projekt 2A: Synthese von Indol-Derivaten als Liganden für den GPR17	203
6.5.1	Synthese der Indol-Vorstufen.....	203
6.5.2	Ringschluss-Methoden	212
6.5.3	Indolsynthese ohne Isolation der Vorstufe	217
6.5.4	Modifikationen am Indol-Grundgerüst.....	224
6.5.5	Verseifung.....	230
6.6	Projekt 2B: Synthese von Xanthin-Derivaten als Liganden für den GPR17	246
6.7	Funktionelle Studien am humanen GPR17-Rezeptor	253
6.7.1	Messung der intrazellulären Calcium-Ausschüttung ¹⁴⁴	253
6.7.2	Messung der Anreicherung von radioaktivem Inositoltrisphosphat ¹⁴⁴	254
6.7.3	Messung der dynamischen Massen-Umverteilung ¹⁴⁴	254
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	257
8	LITERATURVERZEICHNIS	263
9	DANKESCHÖN!	281
10	ANHANG	283

1 REZEPTOREN

Damit Wirkstoffe im Körper einen Effekt auslösen können, müssen sie an einen körpereigenen Reaktionspartner binden, der ihre Wirkung vermittelt. Für viele Wirkstoffe handelt es sich bei diesen Reaktionspartnern um Rezeptoren. Rezeptoren sind intrazelluläre oder membranständige Proteine, die einen Liganden an einer spezifischen Bindungsstelle anlagern. Als Liganden können sowohl verschiedene körpereigene Stoffe (z. B. Neurotransmitter, Hormone, Vitamine, Wachstumsfaktoren u. a.)¹ als auch synthetisch hergestellte Wirkstoffe dienen. Bei intrazellulären Rezeptoren dringen die Liganden zunächst in die Zelle ein und binden dann an ihren korrespondierenden Rezeptor. Bei transmembranären Rezeptoren bindet der Ligand hingegen auf der extrazellulären Seite an den Rezeptor und löst anschließend eine Signalkaskade aus, die eine entsprechende biochemische Reaktion innerhalb der Zelle erzeugt. Die Zahl pharmakologischer Rezeptoren ist, wie die anderer körpereigener, funktionaler Moleküle, begrenzt; die Ligandbindung ist somit sättigbar.¹⁻³

1.1 EINTEILUNG DER REZEPTOREN

Zu den **intrazellulären Rezeptoren** gehören die DNA-Transkriptions-regulierenden Rezeptoren. Diese kommen im Zytoplasma und im Zellkern vor. Für die entsprechenden Liganden wird vorausgesetzt, dass sie hydrophober Natur sind und die Zellmembran zu durchdringen vermögen oder ein Transportsystem zur Überwindung der Zellmembran benutzen können. Sie verfügen meist über zwei spezifische Bindungsstellen. Durch die Bindung eines Liganden (meist Hormone) an die erste Bindungsstelle wird eine Haftregion freigegeben, die zur Anlagerung an die Promotor-Region bestimmter Gene geeignet ist und so die Transkription hemmt oder begünstigt.² Liganden der DNA-Transkriptions-regulierenden Rezeptoren sind u. a. Steroidhormone, Retinoide und Schilddrüsenhormone.

Transmembranäre Rezeptoren können unterteilt werden in:

- Ligand-gesteuerte Ionenkanäle,
- Rezeptoren mit Enzymaktivität und
- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Die Bindung eines Liganden (z. B. ATP, Glycin, Serotonin) an einen Ligand-gesteuerten Ionenkanal (einen ionotropen Rezeptor) bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins, die zu einem Öffnen oder Schließen des Kanals führt. Beim Öffnen eines Ionenkanals kommt es zu einem Fluss von Ionen entlang des Konzentrationsgradienten zwischen Intra- und Extrazellulär-

raum. Aufgrund der unterschiedlichen Geometrie und Ladungsverteilung können nur bestimmte Ionen durchfließen.

Physiologisch und pharmakologisch interessant ist, dass die Untereinheiten von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen als Isoformen mit verschiedenen Aminosäure-Sequenzen vorkommen können. Diese Untereinheiten können auf kombinatorische Weise zu Rezeptoren unterschiedlicher Funktion zusammengebaut werden. Dabei ist es auch möglich, dass alle Subtypen auf denselben Liganden ansprechen aber unterschiedliche Effekte vermitteln.

Die extrazelluläre Bindung eines Liganden an einen Enzym-assoziierten Rezeptor führt durch Dimerisierung der Rezeptorproteine oder Autophosphorylierung des Rezeptors zu einer Aktivierung eines intrazellulär lokalisierten Enzyms – meist einer Kinase. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Klasse zählen die Tyrosinkinase-Rezeptoren sowie Rezeptor-Serin- bzw. Threoninkinasen.¹⁻⁴

Da die vorliegende Arbeit sich mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren befasst, werden diese im folgenden Kapitel näher betrachtet.

1.2 AUFBAU UND FUNKTION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) sind von zentraler Bedeutung für die Signaltransduktion. In Vertebraten wurden bisher mehr als 1000 Gene identifiziert, die für GPCRs kodieren. Die Hälfte dieser Rezeptoren wird durch sensorische Signale aktiviert und ist für die Vermittlung dieser Reize verantwortlich. Die andere Hälfte wird durch endogene Liganden (Neurotransmitter, Hormone, Peptide u. a.) aktiviert.²

Das Rezeptorprotein besteht aus sieben α -helikalen transmembranären Segmenten, die je aus 20 – 25, meist hydrophoben Aminosäuren zusammengesetzt sind.³ Diese Segmente sind durch je drei extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden. Der N-Terminus befindet sich auf der extrazellulären, der C-Terminus auf der intrazellulären Seite der Membran (siehe Abbildung 1.1).

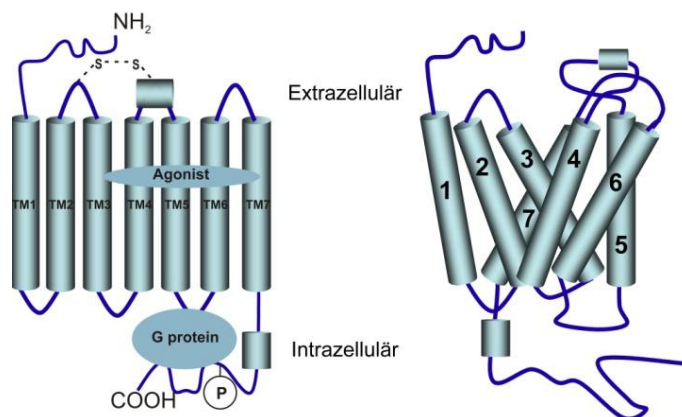


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors am Beispiel eines Rhodopsin-ähnlichen Rezeptors (siehe unten).⁵

Die GPCR-Superfamilie kann weiterhin in sechs Hauptfamilien unterteilt werden, die untereinander nur geringe Sequenzhomologie und nur einige funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen.⁶

Familie A wird auch als Rhodopsin-Familie bezeichnet.⁷ Sie ist die größte der Hauptfamilien und beinhaltet vor allem Rezeptoren für Duftstoffe und kleine Liganden.⁷ Sie kann weiterhin in drei Untergruppen unterteilt werden. Gruppe 1 enthält Mitglieder für kleine Liganden (z. B. Rhodopsin u. a.) und die β -adrenergen Rezeptoren.⁷ Die Bindungsstelle für diese Liganden befindet sich im Inneren der Transmembranregionen. Gruppe 2 enthält GPCRs für Peptide.⁷ Die Bindungsstelle für diese großen Liganden beinhaltet den N-Terminus, die extrazellulären Schleifen und die zum extrazellulären Teil der Membran hingewandten Teile der Transmembranregionen. Gruppe 3 besteht aus Glycoprotein-Hormon-bindenden Rezeptoren.^{7,8} Liganden dieser Rezeptoren sind z. B. das luteinisierende Hormon (LH) oder das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH).⁸ Sie besitzen eine große extrazelluläre Domäne. Die Bindungsstelle ist auch für diese Liganden vornehmlich extrazellulär und schließt vor allem die Schleifen 1 und 3 ein.⁷

Familie B wird auch Sekretin-Familie genannt. Sie besteht aus etwa 60 Mitgliedern. Aufgrund des hohen Molekulargewichtes ihrer Liganden, befindet sich die Bindungsstelle überwiegend extrazellulär.⁷

Familie C enthält etwa zwei Dutzend GPCRs, bei denen es sich um metabotrope Glutamat-Rezeptoren, Calcium-sensitive Rezeptoren, GABA_B-Rezeptoren, Geschmacks-Rezeptoren und Geruchs-Rezeptoren handelt. Wie die Rezeptoren der Sekretin-Familie enthalten auch diese Rezeptoren eine große N-terminale Ectodomäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist.⁷

Familie D enthält vor allem G_i-gekoppelte Pheromon-Rezeptoren.⁷

Bei den Mitgliedern der **Familie E** handelt es sich um cAMP-Rezeptoren. Diese Rezeptoren konnten bisher nur in *Dictyostelium discoideum*, einem Schleimpilz, nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Rezeptoren zukünftig noch in Vertebraten nachgewiesen werden.⁷

Die **Familie F** enthält schließlich zehn „Frizzled“-Rezeptoren und einen „Smoothed“-Rezeptor. Die „Frizzled“-Rezeptoren werden von Lipoglycoproteinen der Wingless/Int-1 (WNT) Familie aktiviert.⁹ Bei diesen handelt es sich um Signalproteine, die an der embryonalen Entwicklung in verschiedenen Lebewesen beteiligt sind.⁷ „Smoothed“-Rezeptoren werden indirekt durch die sogenannte Hedgehog (HH) Protein-Familie aktiviert, die am Transmembran-Protein Patched (PTCH) binden.¹⁰ PTCH ist ein Inhibitor der „Smoothed“-Rezeptoren. In Anwesenheit von HH kann PTCH die „Smoothed“-Rezeptoren nicht mehr inhibieren und eine nachfolgende, Spezies-abhängige Signalkaskade wird ausgelöst.¹⁰

An der Signaltransduktion der GPCRs ist ein Guaninnucleotid-bindenden Protein (G-Protein) beteiligt. Dieses besteht aus drei Untereinheiten: der 40-50 kDa großen α -Untereinheit, die im Ruhezustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat, der 35 kDa großen β -Untereinheit und

der relativ kleinen ca. 7 kDa großen γ -Untereinheit.² Durch die Bindung eines Liganden kommt es zur Anlagerung und Aktivierung des GDP-gebundenen G-Proteins (siehe Abbildung 1.2). Im Anschluss daran erfolgt ein Austausch von GDP durch GTP (Guanosintriphosphat), wodurch sich die α -Untereinheit von den beiden anderen Untereinheiten und dem Rezeptor abtrennt und ein benachbartes Zielprotein aktivieren oder hemmen kann. Die abgetrennte $\beta\gamma$ -Untereinheit kann ihrerseits andere Effektorproteine binden. Durch die GTPase-Aktivität der α -Region liegt nach Abspaltung von anorganischem Phosphat wieder GDP an der Bindungsstelle vor. Dadurch löst sich die α -Untereinheit vom Effektorprotein und verbindet sich wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Der Rezeptor befindet sich schließlich wieder im Grundzustand und kann erneut durch einen Liganden aktiviert werden.³

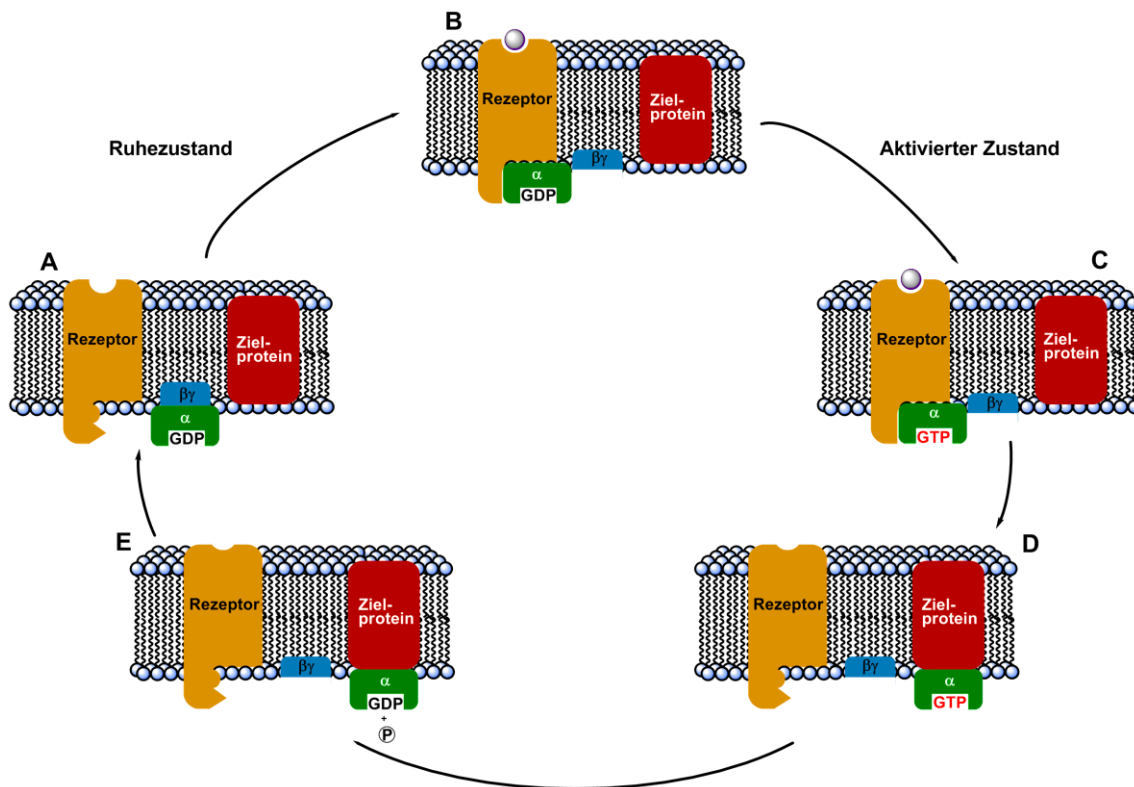


Abbildung 1.2: Funktion eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors in schematischer Darstellung, modifiziert nach Mutschler¹; A: Ruhezustand; B: Bindung des G-Proteins an den durch einen Liganden aktivierten Rezeptor; C: Austausch von GDP durch GTP, Trennung der α - von der $\beta\gamma$ -Untereinheit; D: Aktivierung oder Hemmung des Effektors (Enzym, Ionenkanal) durch die GTP-tragende α - oder die $\beta\gamma$ -Untereinheit; E: Spaltung von GTP in GDP und anorganisches Phosphat

Die Spezifität der Signalübertragung hängt nicht nur von dem jeweiligen Liganden, sondern auch von der Art des G-Proteins ab. Je nach Zusammensetzung dieses heterotrimeren Proteins werden verschiedene Effektorproteine beeinflusst. Für diese Diversität scheint vor allem die α -Einheit von besonderer Bedeutung zu sein.² Mittlerweile sind über 20 verschiedene α -Ein-

heiten bekannt, die sich in vier Gruppen einteilen lassen (siehe Tabelle 1-1). Einige dieser α -Untereinheiten sind durch die Proteine Chloleratoxin (CTX) bzw. Pertussistoxin (PTX) inaktivierbar. Diese katalysieren die ADP-Ribosylierung eines Argininrestes (CTX) bzw. Cysteinrestes (PTX) der α_s - bzw. α_i -Untereinheit. ADP-ribosyliertes $G_{\alpha s}$ kann zwar die Adenylatcyclase noch aktivieren, die Hydrolyse von GTP in GDP ist jedoch nicht mehr möglich. Es kommt zu einer dauerhaften Aktivierung. Im Gegensatz dazu verhindert eine ADP-Ribosylierung von $G_{\alpha i}$ den Austausch von GDP durch GTP. Die $G_{\alpha i}$ -Einheit kann die Adenylatcyclase nicht mehr hemmen.

Tabelle 1-1: Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine anhand der α -Untereinheit^{3,11,12}

G-Protein	Untereinheit	Effektor	Repräsentative Rezeptoren	Toxin ^b
G_s	α_s	\uparrow Adenylatcyclase \uparrow Ca ²⁺ -Kanäle \downarrow Na ⁺ -Kanäle	β -adrenerger Rezeptor, Glukagon-Rezeptor, TSH-Rezeptor u. a.	CTX
	α_{olf}	\uparrow Adenylatcyclase	Olfaktorische Rezeptoren	CTX
G_i	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	\downarrow Adenylatcyclase \uparrow K ⁺ -Kanäle ^a	α_2 -adrenerger Rezeptor	PTX
	α_{oA}, α_{oB}	\downarrow Ca ²⁺ -Kanäle \uparrow K ⁺ -Kanäle ^a \uparrow Phospholipase C ^a	α_2 -adrenerger Rezeptor	PTX
	$\alpha_{t1/2}$	\uparrow cGMP spezifische Phosphodiesterase	Rhodopsin	CTX PTX
	α_g	nicht bekannt	nicht bekannt	PTX
	α_z	\downarrow Adenylatcyclase	nicht bekannt	--
G_q	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{16}$	\uparrow Phospholipase C β	α_1 -adrenerger Rezeptor	--
	α_{15}	nicht bekannt	nicht bekannt	--
G₁₂	α_{12}, α_{13}	Aktivierung von Rho	nicht bekannt	--

^avermutet, aber noch nicht abschließend bestätigt; ^bChloleratoxin (CTX) und Pertussistoxin (PTX) katalysieren die ADP-Ribosylierung eines Argininrestes (CTX) bzw. Cysteinrestes (PTX) der angegebenen α -Untereinheit

Die Adenylatcyclase katalysiert die Bildung von 3',5'-cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP).³ Dieses kann als sogenannter „Second messenger“ vor allem zur Aktivierung von Proteinkinasen führen, die dann weitere Effekte auslösen. Die Adenylatcyclase wird durch die verschiedenen $G_{\alpha s}$ -Untereinheiten sowie die olfaktorischen G-Proteine stimuliert und durch die $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten inhibiert. Das $G_{\alpha t}$ -Protein wird auch als Transducin bezeichnet und befindet sich vor allem in den Zapfen und Stäbchen der Netzhaut und ist für die Lichtwahrnehmung verantwortlich.¹¹ Es aktiviert die 3',5'-cyclisches Guanosinmonophosphat-spezifische Phospho-

diesterase (cGMP-spezifische Phosphodiesterase), die zu einer Hyperpolarisation der Sinneszellen führt und damit eine Reizweiterleitung auslöst. Das $G_{\alpha t}$ -Protein ist eng verwandt mit dem $G_{\alpha g}$ -Protein, welches sich in den Geschmacksknospen befindet. Die genaue Funktion dieses Proteins konnte jedoch noch nicht endgültig aufgeklärt werden.¹¹

Eine weitere große Klasse von Effektormolekülen sind die Phospholipase C-Enzyme, die v. a. durch G_q -Proteine aktiviert werden. Diese katalysieren die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG).³ IP_3 stimuliert durch die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern. Der Anstieg des intrazellulären Calcium-Gehaltes beeinflusst in der Folge eine Vielzahl von Signalwegen, z. B. die Familie der Proteinkinase C (PKC), die Phospholipase A_2 (PLA_2), Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle und die Stickoxid-Synthase (NOS).

Die Aktivierung von G_{12} -gekoppelten Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des kleinen monomeren G-Proteins Rho und damit zu Effekten auf die Zellproliferation und –morphologie.¹³

Neben den bisher genannten Zielproteinen, können die verschiedenen α -Einheiten zusätzlich die Öffnung oder Schließung spannungsgesteuerter Ionenkanäle induzieren.¹¹

Auf eine bestimmte Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die purinergen Rezeptoren, wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

1.3 PURINERGE REZEPTOREN

Purinerge Rezeptoren sind membranständige Proteine, die von Nucleosiden oder Nucleotiden aktiviert werden. 1978 schlug Burnstock eine Einteilung der purinergen Rezeptoren in zwei Untergruppen vor.¹⁴ Die erste Gruppe, selektiv für Adenosin, wurde als P1-Rezeptoren bezeichnet. Vier Subtypen der P1-Rezeptoren wurden kloniert, die A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 genannt werden.¹⁵

Tabelle 1-2: Klassifizierung der P1- bzw. Adenosin-Rezeptoren.¹⁶

	A_1	A_{2A}	A_{2B}	A_3
G-Protein	$G_{i/o}$	G_s	G_s, G_q	G_i, G_q
Effekt	\downarrow cAMP \uparrow IP_3 \uparrow K^+ \downarrow Ca^{2+}	cAMP \uparrow	cAMP \uparrow IP_3 \uparrow	cAMP \downarrow IP_3 \uparrow

Die Unterscheidung erfolgte zunächst nur für die Subtypen A_1 und A_2 aufgrund ihres Verhaltens hinsichtlich ihres Effektorproteins Adenylatcyclase.^{17,18} A_1 -Rezeptoren sind G_i -gekoppelt und führen dadurch zu einer Inhibition der Adenylatcyclase. A_2 -Rezeptoren bewirken über eine $G_{\alpha s}$ -Untereinheit eine Stimulation der Adenylatcyclase. Erst durch Klonierung konnte das Vorhan-

densein des A_{2B} -Rezeptors und des A_3 -Rezeptors bestätigt werden.¹⁹⁻²¹ Der A_{2B} -Rezeptor ist ebenfalls G_s -Protein-gekoppelt und aktiviert die Adenylatcyclase. Der A_3 -Rezeptor ist, wie der A_1 -Rezeptor, G_i -gekoppelt und inhibiert die Adenylatcyclase (siehe Tabelle 1-2).

Die Verteilung der Adenosin-Rezeptoren im Körper ist ubiquitär aber subtypspezifisch. Obwohl mehrere P1-Rezeptorsubtypen auch in einem bestimmten Gewebe vorkommen können, werden sie gewöhnlich in unterschiedlichen Dichten exprimiert (siehe Tabelle 1-3). Über die Verteilung der A_1 - und der A_{2A} -Rezeptoren im Körper ist aufgrund der frühen Entdeckung und des Vorhandenseins pharmakologischer Werkzeuge bisher schon viel bekannt. Die Informationen über die A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren sind hingegen überwiegend durch die Analyse der Expression korrespondierender mRNA entstanden.²²

Tabelle 1-3: Verteilung der P1-Rezeptor-Subtypen im Menschen.²³

Subtyp	Gewebe mit hoher Rezeptordichte	Gewebe mit mittlerer Rezeptordichte	Gewebe mit geringer Rezeptordichte
A_1	Gehirn (Cortex, Cerebellum, Hippocampus), Fettgewebe	Schilddrüse, Rückenmark, Nebenniere, Niere	Lunge, Bauchspeicheldrüse, Leber
A_{2A}	Milz, Thymus, Leukozyten, Blutplättchen	Herz, Lunge, Blutgefäße	Andere Gehirnregionen
A_{2B}	Blinddarm, Dickdarm, Harnblase	Lunge, Blutgefäße, Auge, Mastzellen,	Fettgewebe, Gehirn, Niere, Leber, Ovarien, Nebenniere, Hirnanhangsdrüse
A_3	Lunge, Leber	--	Gehirn, Herz, Niere, Hoden

Die zweite Untergruppe der purinergen Rezeptoren ist selektiv für Nucleotide, wie z. B. Adenosintriphosphat (ATP) oder Adenosindiphosphat (ADP) und wurde als P2 bezeichnet.¹⁴ 1985 erfolgte eine weitere Unterteilung der P2-Purin-Rezeptoren auf Basis ihrer Pharmakologie in P2X- und P2Y-Rezeptoren.²⁴ Die P2X-Rezeptoren gehören zur Familie der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle, die P2Y-Rezeptoren hingegen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Zur Zeit sind sieben P2X-Rezeptor-Subtypen ($P2X_{1-7}$) (siehe Tabelle 1-4) sowie acht P2Y-Rezeptor-Subtypen ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ und $P2Y_{14}$) (siehe Tabelle 1-5) bekannt.²⁵

Die P2X-Rezeptoren werden aus drei Untereinheiten gebildet.²⁶ Sowohl Heterotrimere als auch Homotrimere können gebildet werden.²⁷ Die Aktivierung der verschiedenen Rezeptorsubtypen erfolgt bei allen durch ATP und führt zu einer Öffnung von Natrium-, Kalium- und vor allem Calcium-Kanälen.²⁸

Tabelle 1-4: Klassifizierung der P2X-Rezeptor-Subtypen; modifiziert nach Burnstock.²⁹

P2X-Subtyp	Gewebeverteilung	Agonisten ^a	Transduktionsmechanismus
P2X ₁	glatte Muskulatur, Herz, Blutplättchen, Cerebellum, Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks	$\alpha, \beta\text{-meATP} = \text{ATP} = 2\text{-MeSATP}$, L- $\beta, \gamma\text{-meATP}$	Kationenkanal (v. a. Ca^{2+} und Na^+)
P2X ₂	glatte Muskulatur, ZNS, Retina, autonome und sensorische Ganglien, Chromaffinzellen	$\text{ATP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} \geq 2\text{-MeSATP} \gg \alpha, \beta\text{-meATP}$	Ionenkanal (v. a. Ca^{2+})
P2X ₃	sensorische Neuronen, Nucleus tractus solitarii, einige sympathische Neuronen	$2\text{-MeSATP} \geq \text{ATP} \geq \alpha, \beta\text{-meATP} \geq \text{Ap}_4\text{A}$	Kationenkanal
P2X ₄	ZNS, Hoden, Dickdarm	$\text{ATP} \gg \alpha, \beta\text{-meATP}$, CTP	Ionenkanal (v. a. Ca^{2+})
P2X ₅	Proliferierende Zellen in der Haut, Darm, Blase, Thymus, Rückenmark	$\text{ATP} \gg \alpha, \beta\text{-meATP}$, $\text{ATP}\gamma\text{S}$	Ionenkanal
P2X ₆	ZNS, motorische Neuronen im Rückenmark	als Homomultimer nicht aktiv	Ionenkanal
P2X ₇	Makrophagen, Mastzellen, Mikroglia, Bauchspeicheldrüse, Haut, Endokrine Organe Apoptotische Zellen in z. B. Immunzellen, Bauchspeicheldrüse, Haut	$\text{BzATP} > \text{ATP} \geq 2\text{-MeSATP} \gg \alpha, \beta\text{-meATP}$	Kationenkanal

^aAbkürzungen: AP_4A : Diadenosintetraphosphat; $\text{ATP}\gamma\text{S}$: Adenosin-5'-(γ -thio)-triphosphat; BzATP: 2'&3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP; CTP: Cytosintriphosphat; $\alpha, \beta\text{-meATP}$: α, β -Methylen-ATP; L- $\beta, \gamma\text{-meATP}$: L- β, γ -Methylen-ATP; 2-MeSATP: 2-Methylthio-ATP

Der biologische Effekt, den die P2Y-Rezeptoren auslösen, hängt von ihrer Kopplung an die entsprechenden G-Proteine ($G_{q/11}$, G_{oi} , G_{os}) ab. Die Rezeptoren P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆ sind über G_q -Proteine an die Phospholipase C gekoppelt.³⁰ Eine Stimulation dieser Rezeptoren führt damit zu einem Anstieg der intrazellulären IP₃- und DAG-Konzentration, gefolgt von einem Anstieg intrazellulären Calciums (vgl. Kapitel 1.2). Der P2Y₁₁-Rezeptor kann sowohl an die Phospholipase C als auch an die Stimulation der Adenylatcyclase gekoppelt sein.³⁰ Die Rezeptoren P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ bewirken über G_i -Proteine eine Inhibition der Adenylatcyclase.³⁰ Die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren erfolgt im Gegensatz zu den P2X-Rezeptoren durch unterschiedliche, endogene Agonisten. P2Y₁, P2Y₁₂ und P2Y₁₃ werden durch ADP aktiviert, P2Y₂ und P2Y₁₁ durch ATP. Die Aktivierung der Rezeptoren P2Y₂ und P2Y₄ erfolgt durch UTP. Der endogene Agonist der P2Y₆ ist UDP. Allein P2Y₁₄ kann durch UDP-Zucker aktiviert werden (siehe Tabelle 1-5).^{30,31}

Tabelle 1-5: Klassifizierung der P2Y-Rezeptor-Subtypen

Rezeptor	P2Y							
Rezeptortyp	G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR)							
Subtyp	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
endogener Ligand	ADP	UTP ATP	UTP	UDP	ATP	ADP	ADP	UDP- Glucose,
Signalweg	G _q	G _q	G _q	G _q	G _q , G _s	G _i	G _i	G _i
Effektor-protein	↑PLCβ	↑PLCβ	↑PLCβ	↑PLCβ	↑PLCβ	↓AC	↓AC	↓AC
Effekt	↑IP ₃ , ↑DAG, ↑Ca ²⁺	↑IP ₃ , ↑DAG, ↑Ca ²⁺	↑IP ₃ , ↑DAG, ↑Ca ²⁺	↑IP ₃ , ↑DAG, ↑Ca ²⁺	↑IP ₃ , ↑DAG, ↑Ca ²⁺	↓cAMP	↓cAMP	↓cAMP

P2Y-Rezeptoren weisen eine breite Gewebeverteilung auf. Sie befinden sich in Blutplättchen, der Skelettmuskulatur, in neuronalen Geweben, dem Verdauungstrakt, den Organen (Lunge, Herz, Leber, Bauchspeicheldrüse, Niere), der Plazenta sowie im Gehirn.³² Aufgrund dieser breiten Verteilung der Rezeptoren im Körper stellen sie interessante Targets für neue Arzneistoffe dar.

Kürzlich wurde zusätzlich zu den P1- und P2-Rezeptoren eine weitere Familie purinerger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beschrieben.^{33,34} Diese werden von der Nucleobase Adenin aktiviert. Da die Dephosphorylierung der P2-Liganden ATP und ADP zum P1-Liganden Adenosin führt und ein weiterer Abbau (Spaltung der nucleosidischen Bindung durch Phosphorylase) in der Nucleobase Adenin resultiert, werden die als „P0-Rezeptoren“ bezeichnet.³⁵

Da die vorliegende Arbeit auf dem Gebiet der P1-Rezeptoren sich vorrangig mit dem Adenosin-A₁-Rezeptor befasst, wird im folgenden Kapitel auf diesen näher eingegangen.

1.3.1 DER ADENOSIN-A₁-REZEPTOR

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde der A₁-Rezeptoren bereits aus vielen verschiedenen Spezies kloniert. Die Variabilität der Aminosäuresequenzen der A₁-Rezeptoren verschiedener Spezies (Hund, Ratte, Rind) beträgt weniger als 10 %.¹⁶ Zwischen Rind und Mensch machen diese Unterschiede sogar weniger als 5 % der Aminosäuresequenz aus.¹⁶ Gleichwohl reichen auch diese geringen Abweichungen schon aus, um signifikante Unterschiede in der Ligandbindung³⁶ und geringere Unterschiede im Desensitivierungs-Mechanismus zu verursachen.

Durch seine Kopplung an verschiedene G-Proteine der G_i- und G_o-Familie ist der A₁-Rezeptor in der Lage, verschiedenste Signale zu vermitteln. Der bedeutendste Signalweg ist dabei die Hemmung der Adenylatcyclase über die G_{oi}-Proteine. Dies führt zu einer verminderten Bildung des

sekundären Botenstoffs cAMP (siehe Kapitel 1.2). Diese Kopplung des A₁-Rezeptors an die Adenylatcyclase wurde bereits in sehr vielen Geweben (Gehirn, Fettgewebe, Hoden u. a.) beschrieben.¹⁶ Weiterhin kann der A₁-Rezeptor eine Aktivierung der Phospholipase C bewirken, die eine vermehrte Ausschüttung von DAG, IP₃ und damit intrazellulärem Calcium auslöst. Für den endogenen A₁-Rezeptor wurde dieser Signalweg bereits in DDT₁-Zellen (glatte Muskulatur im Samenleiter von Hamstern), Myometrium (glatte Muskulatur der Gebärmutter),^{37,38} Renalzellen (Nierengewebe)³⁹ u. a.¹⁶ nachgewiesen.

Eine Aktivierung verschiedener Typen von K⁺-Kanälen durch den A₁-Rezeptor wurde bereits in Neuronen und im Herzmuskel beschrieben: In supraventrikulärem Gewebe z. B. können dieselben K⁺-Kanäle sowohl durch Acetylcholin (Bindung an muskarinische Rezeptoren) als auch durch Adenosin (Bindung an den A₁-Rezeptor) aktiviert werden.⁴⁰ Diese sogenannten muskarinischen Kalium-Kanäle sind durch den jeweiligen Rezeptor direkt (cAMP-unabhängig) an Pertussistoxin-sensitive G_i-Proteine gekoppelt.⁴¹ Der A₁-Rezeptor kann jedoch auch mit seiner G_{α_i}-Einheit an der Aktivierung ATP-sensitiver K⁺-Kanäle beteiligt sein.⁴² Eine Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle bewirkt eine Reduktion des Aktionspotentials und der Potentialdauer sowie eine Vasodilatation und eine Erhöhung des Blutflusses.

Schließlich wurde die Inhibition von Ca²⁺-Strömen durch den A₁-Rezeptor in verschiedenen Systemen beschrieben (z. B. im Spinalganglion,⁴³ im Gehirnstamm von Ratten,⁴⁴ u. a.¹⁶).

Eine länger andauernde Aktivierung eines Rezeptors führt häufig zu Desensitivierung. Die Desensitivierung kann auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktions-Kaskade erfolgen. Eine langsam erfolgende Desensitivierung ist gewöhnlich auf die Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor, die Internalisierung des Rezeptors in ein extrazelluläres Kompartiment oder die Herunterregulierung des Rezeptors mit dem noch assoziierten G-Protein zurückzuführen. Für den A₁-Rezeptor kann dieser Prozess bis zu mehreren Tagen dauern und ist damit langsamer als z. B. die Desensitivierung des A₃-Rezeptors, die in wenigen Minuten erfolgen kann.¹⁶ Diese langsam erfolgende Art der Desensitivierung kann sowohl homogen als auch heterogen sein. Bei der homogenen Desensitivierung kommt es zu einer Desensitivierung nur der Rezeptoren, die aktiviert wurden. Bei der heterogenen Desensitivierung hingegen erfolgt eine Desensitivierung eines Rezeptors auch, wenn ein anderer, heterogener Rezeptor aktiviert wurde.⁴⁵

Die Desensitivierung von Rezeptoren kann im Allgemeinen jedoch auch sehr schnell erfolgen. Durch GPCR-spezifische Kinasen (sog. GRKs) und/oder Kinasen, die durch intrazelluläre Sekundärbotenstoffe reguliert werden, können der C-Terminus oder die intrazellulären Schleifen phosphoryliert werden. In verschiedenen Untersuchungen am A₃-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten des C-Terminus erfolgt. Der phosphorylierte Rezeptor ist dann in der Lage, an Arrestine zu binden, die das G-Protein vom Rezeptor ablösen. Dieser Prozess kann innerhalb weniger Minuten erfolgen. Palmer et al. zeigten

jedoch, dass der A₁-Rezeptor an seinem C-Terminus keine entsprechenden Serin- und/oder Threoninreste aufweist und somit nicht durch GRKs phosphoryliert werden kann.⁴⁶

Umgekehrt kommt es durch eine länger andauernde Exposition mit Antagonisten des A₁-Rezeptors entweder zu einer Heraufregulierung oder Sensitivierung des Rezeptors. Der A₁-Antagonist Theophyllin führt z. B. bei chronischer Gabe (21 Tage) zu einer Steigerung der Dichte der A₁-Rezeptoren in Rattencortex.⁴⁷ Eine chronische Verabreichung von Coffein bewirkt im Rattencortex hingegen eine Sensitivierung des Rezeptors.⁴⁸ Der Rezeptor liegt im Normalfall in zwei verschiedenen Affinitäts-Zuständen vor. Ein Drittel der Rezeptoren befindet sich in einem hochaffinen Zustand und zwei Drittel in einem niedrigaffinen Zustand. Nach chronischer Verabreichung von Coffein (28 Tage) befinden sich alle Rezeptoren im hochaffinen Zustand, die Anzahl der Rezeptoren in der Membran bleibt jedoch unverändert.

1.3.2 ADENOSIN-A₁-REZEPTOR-AGONISTEN

A₁-Rezeptor-Agonisten sind überwiegend Derivate des physiologischen Liganden Adenosin (**1**). Zur Beeinflussung der Affinität und Selektivität von Adenosin sind Veränderungen in drei Positionen des Moleküls möglich (siehe Abbildung 1.3).

Die ersten bekannten Subtyp-spezifischen A₁-Rezeptor-Agonisten waren in N⁶-Position monosubstituiert. Zu diesen Verbindungen zählen N⁶-(2-Phenylisopropyl)adenosin (**R-PIA**, **2**), N⁶-Cyclohexyladenosin (**CHA**, **5**) und N⁶-Cyclopentyladenosin (**CPA**, **3**) (siehe Tabelle 1-6). *N,N*-Disubstituierte Derivate hingegen weisen eine stark verminderte Rezeptoraffinität auf. Die Selektivität für den A₁-Rezeptor konnte mit steigender Größe und Sperrigkeit der Reste in N⁶-Position verbessert werden.

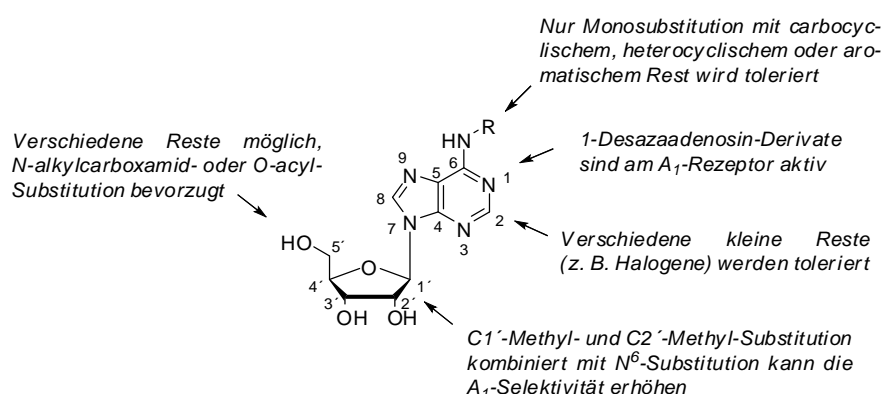
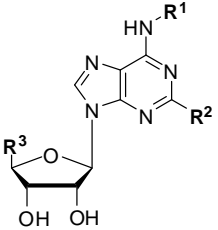
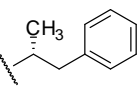

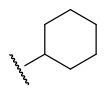
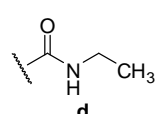


Abbildung 1.3: Allgemeine Struktur von A₁-Rezeptor-Agonisten.

Eine Substitution in 2-Position wird vom A₁-Rezeptor toleriert. Bei einigen N⁶-substituierten Verbindungen kann eine zusätzliche 2-Substitution die Affinität sogar noch steigern (z. B. 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosin (**CCPA**, **4**)).

Tabelle 1-6: Affinität einiger ausgewählter A₁-Rezeptor-Agonisten; modifiziert nach Yan et al.²³

 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;">    </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;">  </div>								
Verbindung	R ¹	R ²	R ³	A ₁ ^a	A _{2A} ^a	A _{2B} ^b	A ₃ ^a	Lit.
1 Adenosin	H	H	CH ₂ OH	≈ 100 (h) 73 (r)	310 (h) 150 (r)	15000 (h) 5100 (r)	290 (h) 6500 (r)	23,49
2 R-PIA	a	H	CH ₂ OH	2.6 (r) 2.04 (h)	117 (r) 860 (h)	11200 (h)	16 (h)	50,51
3 CPA	b	H	CH ₂ OH	5.0 (r) 2.3 (h)	3370 (r) 794 (h)	18600 (h)	26 (r) 42 (h)	50,52,53
4 CCPA	b	Cl	CH ₂ OH	7.43 (r) 0.8 (h)	640 (r) 2270 (h)	18800 (h)	30 (r) 43 (h)	50,52,53
5 CHA	c	H	CH ₂ OH	21 (r)	600 (r)	160000 (h)	176 (r) 1025 (h)	52,54
6 NECA	H	H	d	14 (h)	20 (h)	6.2 (h)	2400 (h)	50

^aK_i-Werte (in nM); ^bEC₅₀-Werte (in nM) aus Adenylatcyclase-Assays; r = Ratte, h = human

Weiterhin ist eine Modifikation in 5'-Position möglich. 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin (NECA, **6**), welches eine 5'-Carboxamidogruppe trägt, wurde zunächst als selektiver A_{2A}-Rezeptor-Agonist eingeschätzt. Es zeigte sich jedoch, dass die Verbindung stattdessen als nichtselektiver Agonist an verschiedene Adenosin-Rezeptor-Subtypen binden kann. Eine Einführung eines Cyclopentylrestes in Position N⁶ führte zu einem selektiven A₁-Agonisten, der im Vergleich zu den entsprechenden 5'-Hydroxy-Verbindungen über eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit und pharmakodynamische Aktivität verfügt.²³

An der Ribose-Struktur sind Modifikationen nur eingeschränkt möglich. Eine Entfernung der Hydroxygruppen in 2'- und 3'-Position führt zu einem kompletten Aktivitätsverlust. Eine Methylierung an der 1'- oder 2'-Position und eine zusätzliche N⁶-Substitution bewirken eine leichte Verringerung der Affinität am A₁-Rezeptor, allerdings wird die Selektivität erhöht.

1.3.3 ADENOSIN-A₁-REZEPTOR-ANTAGONISTEN

Natürlich vorkommende Methylxanthine wie Theophyllin oder Coffein waren die ersten bekannten Antagonisten für die Adenosin-Rezeptoren. Die vergleichsweise niedrige Affinität im mikromolaren Bereich und die geringe Selektivität der bis dahin bekannten Antagonisten führten zur Entwicklung neuer A₁-Rezeptor-Antagonisten.^{55,56} Zunächst wurden Verbindungen synthetisiert, die als Grundgerüst Xanthin besaßen (siehe Abbildung 1.4).

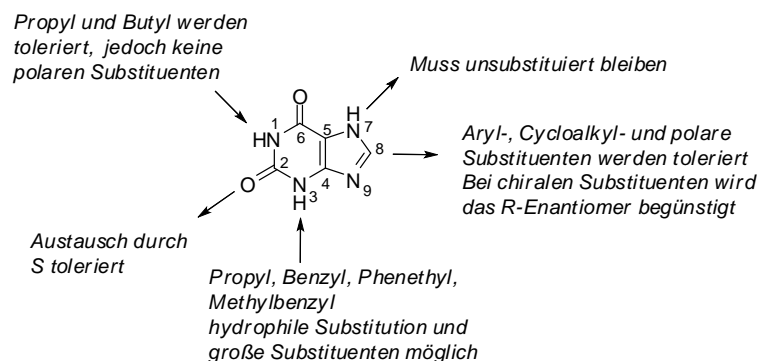


Abbildung 1.4: Struktur-Wirkungs-Beziehung von Xanthin-Derivaten als A₁-Rezeptor-Antagonisten, modifiziert nach Müller⁵⁷

Vor allem eine Modifikation mit lipophilen Resten in der 8-Position bewirkt eine deutliche Verbesserung der Affinität und Selektivität am A₁-Rezeptor.^{58,59} Polare Reste in Position 3 und 8 werden toleriert und erhöhen die Wasserlöslichkeit.⁵⁷ Auch eine Substitution in N1- oder N3-Position kann die Affinität entscheidend erhöhen, wobei vor allem große, unpolare Reste wie Propyl, Butyl oder Benzyl-Substituenten einen positiven Effekt haben.⁶⁰ Eine Substitution mit polaren Resten wird in N1-Position im Gegensatz zur N3-Position vom A₁-Rezeptor nicht toleriert.⁶⁰⁻⁶² In N7-Position ist die unsubstituierte NH-Funktion aufgrund ihrer Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden von entscheidender Bedeutung, und N7-substituierte Verbindungen sowie N7-Desaza-Verbindungen besitzen nur geringe oder kaum Affinität.⁵⁶ 9-Desaza-Verbindungen sind hingegen sogar 2-3fach aktiver als ihre Stickstoffhomologen.⁶³ 2-Thioxanthine sind in ihrer Affinität vergleichbar mit ihren Sauerstoffhomologen, während 6-Thioxanthine eine geringere Affinität aufweisen.^{56,64} Diese Ketogruppe ist vermutlich an der Bildung einer Wasserstoffbrücke beteiligt.

Der bekannteste Vertreter der Xanthin-basierten A₁-Rezeptor-Antagonisten ist 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX, **27a**), das eine 1000fach höhere Potenz am Ratten-A₁-Rezeptor im Vergleich zum Ratten-A_{2A}-Rezeptor besitzt.⁶⁵ Dennoch ist diese Subtyp-Selektivität bei den Rezeptoren aus menschlichem Gewebe geringer ausgeprägt.⁵⁰

Tricyclische Imidazol-Derivate sind ebenfalls vom Xanthin abgeleitet. Das Vorhandensein eines zusätzlichen basischen Stickstoff-Atoms erhöht die Wasserlöslichkeit der entsprechenden Verbindungen.⁶⁶

Später wurden A₁-Rezeptor-Antagonisten entwickelt, die nicht Xanthin als Grundgerüst verwenden. Darunter befinden sich Adenin-Derivate und verschiedene weitere kondensierte heterocyclische Verbindungen. Eine detaillierte Übersicht über diese Antagonisten ist in verschiedenen Publikationen zu finden.^{56,67-69}

1.3.4 DER A₁-REZEPTOR ALS THERAPEUTISCHE ZIELSTRUKTUR

Der A₁-Adenosin-Rezeptor ist im Körper ubiquitär vorhanden und dadurch in der Lage, eine Vielzahl von Effekten auszulösen. Damit stellt er eine wichtige therapeutische Zielstruktur dar.

Eine Auswahl an therapeutischen Einsatzmöglichkeiten ist in Tabelle 1-7 zu finden.

Tabelle 1-7: Wirkung und therapeutischer Einsatz von A₁-Adenosin-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten

Expressionsort/Krankheitsbild	Effekt	Lit.
ZNS		
<i>Hypoxie/Ischämie</i>	A ₁ R-Agonisten wirken neuroprotektiv.	70
<i>Schmerzwahrnehmung</i>	Aktivierung des A ₁ -Rezeptors wirkt antinozizeptiv.	71
	Positive allosterische Modulation des A ₁ -Rezeptors reduziert Allodynie.	
<i>Schlaf-Wach-Regulation</i>	Der physiologische A ₁ R-Agonist, Adenosin, wirkt schlaffördernd.	72
<i>Epilepsie</i>	Adenosin wirkt antikonvulsiv.	71
<i>Bewusstsein, Lernen, Erinnern</i>	A ₁ R-Antagonisten können bei der Behandlung von Erinnerungsstörungen eingesetzt werden.	73
<i>Angstzustände</i>	A ₁ R-Agonisten wirken anxiolytisch.	74
<i>Alkoholabhängigkeit</i>	A ₁ R-Agonisten mildern Angstzustände während des Alkohol-Entzugs.	75
Herz		
	Adenosin unterdrückt die Aktivität des Atrio-ventrikularknotens und führt damit zu einer negativen Chronotropie.	76
	Adenosin bewirkt eine negative Dromotropie.	77
	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors vor einer Ischämie wirkt kardioprotektiv.	78
Spermatozoen		
	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors begünstigt die Beweglichkeit der Spermien im weiblichen Genitaltrakt.	79
	A ₁ R-Agonisten begünstigen die Akrosomreaktion.	79
Asthma		
	Die inhalative Gabe des physiologischen A ₁ R-Agonisten Adenosin verursacht eine Bronchokonstriktion, eine Inflammation der Atemwege und fördert den Atemwegsumbau.	80-82
	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors fördert die Schleimsekretion.	83,84
Entzündungskrankheiten		
<i>Neutrophile Granulozyten</i>	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors begünstigt die Chemotaxis und die Adhärenz am Endothelium (proinflammatorisch).	85,86

Expressionsort/Krankheitsbild	Effekt	Lit.
<i>Monozyten</i>	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors verstärkt die Fcγ-Rezeptor-vermittelte Phagozytose (proinflammatorisch).	87
<i>Dendritische Zellen</i>	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors begünstigen die Chemotaxis von undifferenzierten dendritischen Zellen.	88
Wundheilung, Fibrose, Angiogenese	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors stimuliert die Bildung von <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) aus Monozyten.	89
	Die Aktivierung des A ₁ -Rezeptors begünstigt die Wanderung der endothelialen Vorläuferzellen zum Ort der ischämischen Verletzung im Herz.	90
Krebserkrankungen	Die Aktivierung von A ₁ -Rezeptoren an Mikrogliazellen inhibiert das Wachstum von Glioblastomen.	91
Nierenerkrankungen	Die Aktivierung der A ₁ -Rezeptoren führt zu einer Reduktion der Glomerulären Filtrationsrate, reguliert das tubuloglomeruläre Feedback und inhibiert die Renin-Sekretion.	92-94
	Die Aktivierung der A ₁ -Rezeptoren stimuliert die Reabsorption von Flüssigkeit, Na ⁺ -Ionen, Hydrogencarbonat-Ionen und Phosphationen im proximalen Tubulus.	95-97
	Die Aktivierung von A ₁ -Rezeptoren inhibiert die Na ⁺ -Reabsorption im medullären distalen Tubulus.	93
	Die Aktivierung von A ₁ -Rezeptoren inhibiert die Vasopressin-induzierte cAMP-vermittelte Stimulation der Na ⁺ - und Flüssigkeits-Absorption im Sammelrohr und vermindert die Vasopressin-stimulierte Cl ⁻ -Sekretion.	98
Diabetes und Fettleibigkeit	Die Aktivierung der A ₁ -Rezeptoren inhibiert die gesteigerte Lipolyse bei Insulinresistenz.	99
	Die Aktivierung der A ₁ -Rezeptoren senkt die Bildung von VLDL-Triglyceriden in der Leber.	100

Da die Stimulation des A₁-Adenosin-Rezeptors eine Vielzahl von biologischen Implikationen bewirkt, entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten ein vermehrtes Interesse an der Synthese neuer A₁-Rezeptor-Liganden.^{49,101} Alleine in den Jahren zwischen 1999 und 2007 wurden pro Jahr 10 - 15 neue Patente, die sich mit der Synthese oder der therapeutischen Anwendung neuer A₁-Liganden beschäftigen, veröffentlicht. Wichtige Herausforderungen bei der Entwicklung neuer Verbindungen sind die Subtyp-Selektivität, die pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindungen und die Rezeptor-Desensibilisierung.²³ Das größte Problem stellen jedoch die Nebenwirkungen dar. Durch das weitverbreitete Vorkommen der Rezeptoren lösen viele der Verbindungen Nebeneffekte in fremden Geweben aus.¹⁰²

Adenosin selbst wird unter dem Handelsnamen Adenocard® (Astellas Pharma) in den USA, Kanada und Brasilien zur Behandlung der supraventrikulären Tachykardie eingesetzt, da es die Überleitungszeit am AV-Knoten verlängert (negative Dromotropie).²³ Seine mangelnde Subtyp-Selektivität, die kurze Halbwertszeit (wenige Sekunden) und seine gravierenden kardiovaskulären Nebenwirkungen machen jedoch eine weitergehende Anwendung unmöglich.

Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue Adenosin-Derivate als A₁-Rezeptor-Agonisten zur Therapie entwickelt. Aufgrund der starken Nebenwirkungen schafften es jedoch nur wenige dieser Wirkstoffe in die klinischen Studien.

Die ersten A₁-Agonisten, die, abgesehen von Adenosin, in klinischen Studien evaluiert wurden, waren die intravenösen Antiarrhythmika Tecadenoson (**7**)¹⁰³ und Selodenoson (**8**)¹⁰⁴ (siehe Abbildung 1.5).

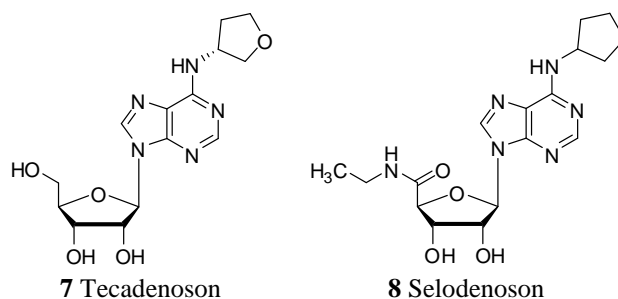


Abbildung 1.5: Tecadenoson (7) und Selodenoson (8) wurden als potentielle antiarrhythmische A₁-Rezeptor-Agonisten in klinischen Studien evaluiert.

Um die Nebenwirkungen zu minimieren, wurden oral verfügbare, partielle A₁-Rezeptor-Agonisten von der Firma CV Therapeutics entwickelt. Diese wurden z. B. durch den Austausch der 5'-Hydroxy-Funktion von Tecadenoson gegen aromatische Ester oder Sulfide erzeugt (siehe Abbildung 1.6).

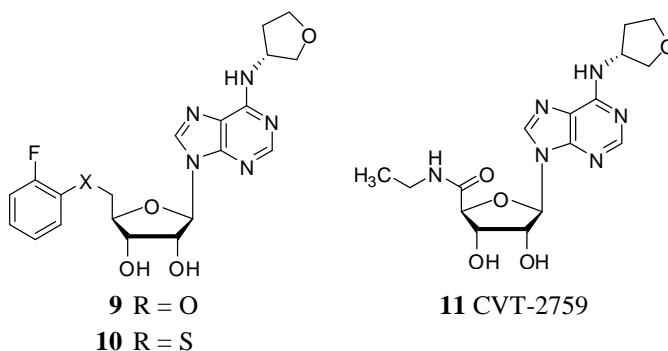


Abbildung 1.6: Partielle A₁-Agonisten könnten als potentielle Antiarrhythmika geringere Nebenwirkungen bewirken als die Vollagonisten Tecadenoson (7) und Selodenoson (8).

Der potenteste Partialagonist dieser Gruppe ist 5'-Desoxy-5'-(2-fluor)phenyloxy-*N*⁶-(*R*)-tetrahydrofuran-3-yl-adenosin (**9**).¹⁰² Dieser sollte als dauerhaft einzunehmendes, orales Medikament entwickelt werden. Nach oraler Gabe wurde jedoch eine kleine Menge des sehr potenten A₁-Vollagonisten Tecadenoson freigesetzt, der seinerseits wieder starke Nebenwirkungen verursacht. Eine weitere klinische Entwicklung des Wirkstoffs konnte deshalb nicht fortgesetzt werden.

Durch die Einführung einer Carboxamido-Gruppe an der 4'-Position des Tecadenosons konnte ein weiterer Partialagonist (CVT-2759, **11**) gewonnen werden (siehe Abbildung 1.6).¹⁰⁵ CVT-2759 bewirkt im Herzen von Meerschweinchen eine Verminderung arrhythmischer Effekte ohne Nebenwirkungen, wie Bradykardie, Vasodilatation, Vorhofflimmern oder einen atrioventrikulären Block 2. Grades auszulösen.^{106,107} Dennoch ist CVT-2759 bisher noch nicht in klinischen Studien getestet worden.

Zur Behandlung von Diabetes Typ II wurden bisher GR79236 (**12**)¹⁰⁸, ARA (**13**)¹⁰⁹ und CVT-3619 (**14**)¹¹⁰ in klinischen Studien getestet (siehe Abbildung 1.7).

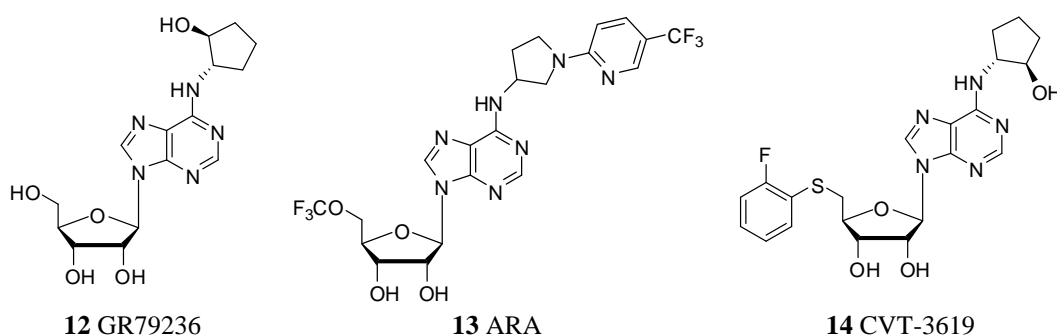


Abbildung 1.7: In klinischen Studien getestete antidiabetische und Insulin-sensitivierende A₁-Rezeptor-Agonisten

Sowohl GR79236 als auch ARA konnten als Vollagonisten am A₁-Rezeptor eine Senkung des Triglyceridgehaltes und der Menge an freien, unveresterten Fettsäuren bewirken. Beide Verbindungen verursachten jedoch auch eine Desensitivierung der A₁-Rezeptoren. Damit ist eine dauerhafte Absenkung der freien Fettsäuren durch Gabe dieser Wirkstoffe nicht möglich. Aus diesem Grund wurde von der Firma CV Therapeutics der Partialagonist CVT-3619 (**14**) entwickelt. Dieser bewirkt eine Reduktion der Adenylatcyclase-Bildung in Adipocyten, die mit der des Vollagonisten Cyclopentyladenosin vergleichbar ist. CVT-3619 wirkt im kardiovaskulären System jedoch nur als Partialagonist. Vermutlich ist die Unterschiedliche Effektivität der Verbindung auf eine große Rezeptor-Reserve und/oder eine hohe Wirksamkeit der Kopplung des Rezeptors an das G_i-Protein in Adipocyten zurückzuführen. Dadurch konnten sowohl eine Desensitivierung des Rezeptors als auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen vermieden werden.

Der hochpotente Agonist GR79236 wurde außerdem in einer klinischen Phase II-Studie zur Behandlung von neuropathischem Schmerz untersucht. Da eine Aktivierung der A₁-Rezeptoren zur einer Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung führt, können A₁-Rezeptor-Agonisten zur Behandlung von Schmerzen eingesetzt werden. GW-493838 ist ein von der Firma GlaxoSmithKline entwickelter A₁-Agonist, dessen Struktur nicht veröffentlicht wurde.^{23,111} Seine analgetischen Effekte wurden in klinischen Studien mit dem Ziel der Behandlung von neuropathischem Schmerz und Migräne untersucht.¹¹² Diese Studien wurden im September 2009 abgeschlossen. Die weitere Entwicklung der Verbindung wurde jedoch eingestellt.

Seit 2005 werden heterocyclische A₁-Rezeptor-Agonisten, die nicht Adenosin als strukturelles Grundgerüst besitzen, zur Behandlung von Angina Pectoris getestet. Die Entwicklung des vielversprechendsten Kandidaten dieser Klasse, 2-Amino-6-((2-(4-chlorphenyl)thiazol-4-yl)methylthio)-4-(4-(2-hydroxyethoxy)phenyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (Capadenoson, **15**) der Firma Bayer, wurde jedoch in Phase II der klinischen Studien abgebrochen und bisher nicht weiter verfolgt.^{113,114}

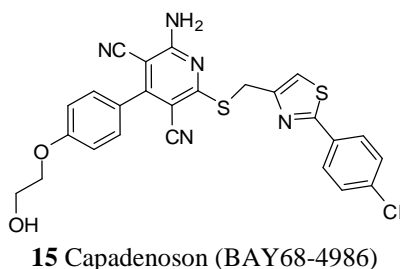
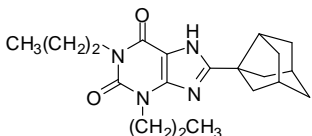
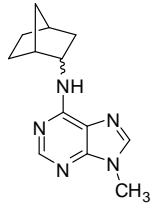
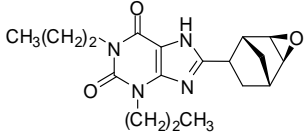
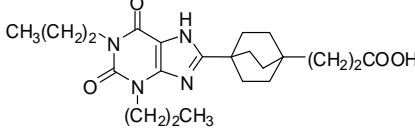
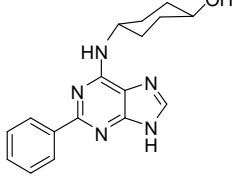
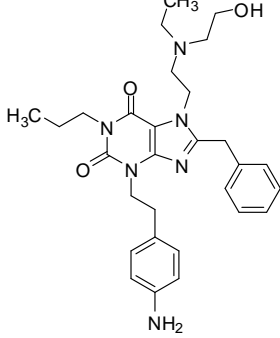
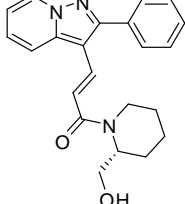
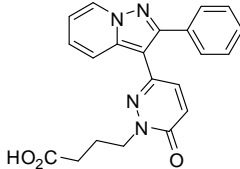


Abbildung 1.8: In klinischen Studien getesteter, Gefäß-erweiternder A₁-Rezeptor-Agonist Capadenoson (BAY68-4986).

Auch zahlreiche Adenosin-Antagonisten wurden in klinischen Studien auf ihr therapeutisches Potential hin untersucht.^{49,101} Eine vielversprechende Verbindung war das Diuretikum 3-Noradmantyl-1,3-dipropylxanthin (KW-3902) der Firma Nova Cardia Merck, das auch unter dem Namen Rolofyllin bekannt ist. Die Wirkung von Rolofyllin sollte über ihren harntreibenden Effekt vermittelt werden. Diuretika führen im Allgemeinen zu einer Entlastung der Stauungssymptomatik bei Herzinsuffizienz. In der sogenannten „Protect Pilot Study“, einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie zur Untersuchung der Wirkung von Rolofyllin an Patienten mit akutem Herzversagen und Nierenfunktionsstörung, zeigte die Verbindung zunächst vielversprechende Ergebnisse.¹¹⁵ In einer größer angelegten Studie mit über 2000 Patienten unterschied sich Rolofyllin jedoch in seiner Wirkung nicht hinreichend von dem eingesetzten Placebo. Die Entwicklung wurde deshalb 2009 eingestellt.¹¹⁶

Weitere A₁-Rezeptor-Antagonisten gegen kardiovaskuläre Erkrankungen sind in Tabelle 1-8 aufgelistet.

Tabelle 1-8: A₁-Rezeptor-Antagonisten und potentielle therapeutische Anwendungsgebiete.

Name (Firma)	Struktur	Klinische Studie	Indikation	Lit.
KW-3902 (NovaCardia Merck)		Phase III	Herzinsuffizienz	¹¹⁷
N-0861 (Aderis)		Phase III	Bradykardie	¹¹⁷
BG-9719 (CV Therapeutics)		Phase II	Herzinsuffizienz	¹¹⁷
BG-9928 (CV Therapeutics)		Phase IIb	Herzinsuffizienz	¹¹⁸
SLV-320 (Solvay)		Phase II	Herzinsuffizienz, Nierenversagen	^{117,118}
L-97-1 (Endacea)			Asthma	¹¹⁷
FK-453 (Astellas Pharma)		Phase II	Bluthochdruck, Nierenversagen	¹¹⁷
FK-838 (Astellas Pharma)		Phase II	Bluthochdruck	¹¹⁷

Ferner könnten A₁-Rezeptor-Antagonisten zur Behandlung von Asthma eingesetzt werden. Die Effekte, die von A₁-Rezeptoren vermittelt werden können und für die Entstehung von Asthma von Bedeutung sind, sind vor allem die Bronchokonstriktion, die Leukocytenaktivierung, die Vermittlung von Entzündungsprozessen, das Auslösen einer bronchialen Hyperreagibilität und die Förderung der Schleimproduktion.⁸¹

Neben dem A₁-Rezeptor beschäftigt sich die vorliegende Arbeit weiterhin mit dem GPR17, einem Waisen-Rezeptor. Die folgenden Kapitel dieses Abschnitts befassen sich deshalb mit der Definition von Waisen-Rezeptoren und der Charakterisierung des GPR17.

1.4 WAISEN-REZEPTOREN

Die Methode der DNA-Sequenzierung, die in den siebziger Jahren entwickelt wurde, ermöglichte eine grundlegend neue Technik zur Erforschung von potentiellen Wirkstoffen. Die Aufklärung des humanen Genoms sollte zum Verständnis der menschlichen Evolution, der Entstehung von Krankheiten und des Zusammenspiels zwischen Umgebung und Vererbung bei der menschlichen Entwicklung beitragen. 1990 wurde schließlich mit dem Humanen Genomprojekt unter der Führung der *National Institutes of Health* (NIH) und des *U.S. Department of Energy* begonnen, welches im Jahr 2003 abgeschlossen war.¹¹⁹ In diesem Zusammenhang wurden die Sequenzen praktisch aller GPCRs aufgeklärt. Für ungefähr 120 der 342 nicht olfaktorischen Rezeptoren ist die Funktion oder der endogene Ligand jedoch noch immer unbekannt.¹²⁰ Diese Rezeptoren bezeichnet man als „Waisen-Rezeptoren“ („orphan receptors“). Die Identifizierung ihrer Liganden ist der erste notwendige Schritt um ihre physiologischen Aufgaben besser verstehen zu können.

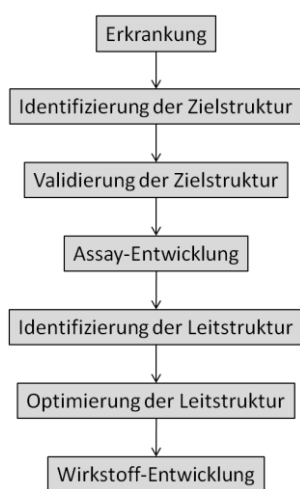


Abbildung 1.9: Konventionelle Wirkstoffentwicklung.

Damit stellen Waisen-Rezeptoren wichtige Zielstrukturen für die Synthese neuer therapeutischer Wirkstoffe dar. Diese Entwicklung wurde in den letzten Jahren vermehrt beschleunigt. Alleine in den letzten zwei Dekaden konnten über 100 Waisen-Rezeptoren ein endogener Ligand zugeordnet werden.¹²¹ Traditionell ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe der finale Schritt in der Analyse einer gut-beschriebenen Erkrankung (siehe Abbildung 1.9). Dabei versuchen Forscher zunächst den Grund für eine bestehende Erkrankung herauszufinden und eine mögliche Zielstruktur zu identifizieren. Diese soll als Angriffspunkt für eine zukünftige Behandlung dienen. Mögliche Zielstrukturen sind z. B. Rezeptoren, Proteine und Enzyme, DNA oder RNA.

Die identifizierten Zielstrukturen müssen anschließend validiert werden. Dies kann z. B. durch Knockout-Tiere, RNA-Interferenz-Methoden oder die Inhibition von Stoffwechselwegen mit chemischen Substanzen erfolgen. Ist die Zielstruktur bekannt, können Assays entwickelt werden, mit denen eine zukünftige Liganden-Suche möglich wird. Diese Assays können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchführbar sein. Mit dem entwickelten Assay können dann aus Substanzbibliotheken oder biologischen Proben mögliche Liganden und schließlich eine Leitstruktur identifiziert werden. Bei der Entwicklung dieser Leitstruktur wird auch auf die Selektivität und die Sicherheit der Verbindung geachtet. Im nächsten Schritt erfolgt eine Optimierung der Leitstruktur. Dabei wird vor allem eine gute Pharmakokinetik Verbindung und die Reduktion von Nebenwirkungen erzielt. Die so erhaltene, optimierte Verbindung geht dann in die weitere Wirkstoffentwicklung und -testung.

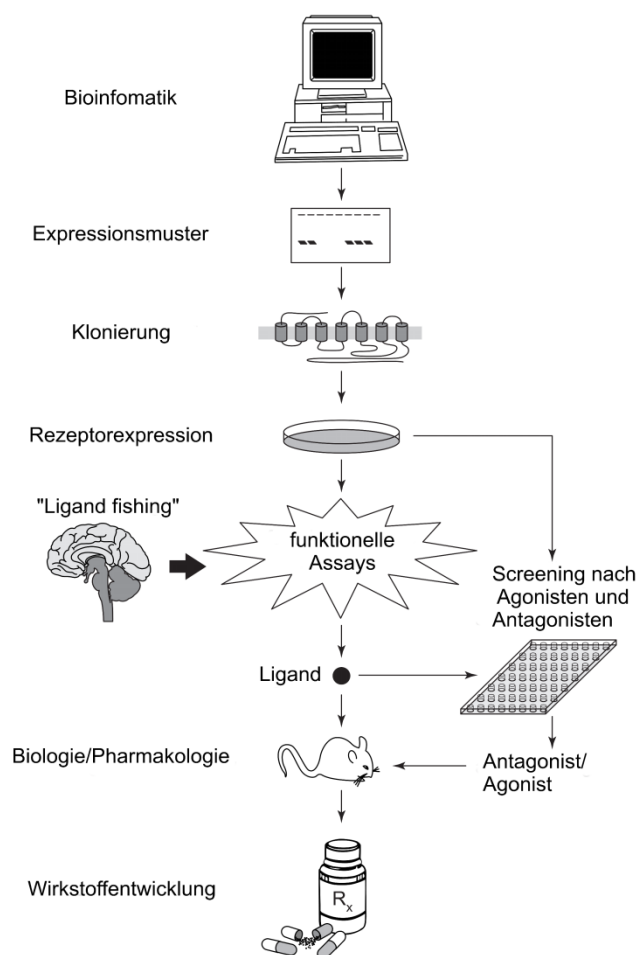


Abbildung 1.10: Die Strategie der „reversen Pharmakologie“, modifiziert nach Stadel et al.¹²²

Obwohl die konventionelle Wirkstoffentwicklung immer noch Verwendung findet, konnte in den vergangenen Jahren eine neue Strategie etabliert werden, die man als „reverse Pharmakologie“ bezeichnet (siehe Abbildung 1.10).^{122,123} Bei dieser Methode dient ein Rezeptor unbe-

kannter Funktion als “Angelhaken” zum “Fischen” eines Liganden.¹²² An dem rekombinant exprimierten Rezeptor können sowohl Gewebeextrakte, die den potentiellen Liganden enthalten, als auch synthetische Verbindungen aus Substanzbibliotheken funktionell getestet werden. Mit den identifizierten Liganden werden anschließend die biologischen und pharmakologischen Wirkungen des Rezeptors untersucht. Wenn schließlich eine Verbindung des Rezeptors mit dem Auftreten oder der Symptomatik einer Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte, ist es möglich, ausgewählte Liganden als Leitstruktur zur Wirkstoffentwicklung einzusetzen.

Der „reverse Pharmakologie“ ist im Vergleich zur konventionellen Wirkstoffentwicklung wesentlich anspruchsvoller und riskanter, da als Ausgangsmaterial ein unbekannter Rezeptor verwendet wird, von dem noch keine Verbindung zur Entstehung einer Erkrankung bekannt ist. Dafür ist das Potential der Wirkstoff-Entwicklung, das sich durch die Identifizierung der Waisen-Rezeptoren bietet, nahezu unbegrenzt. Es ermöglicht die Entdeckung von Wirkstoffen auch für vorher nicht behandelbare Erkrankungen.

1.5 DER GPR17

1.5.1 DEFINITION UND ENTDECKUNG

Der GPR17 ist ein G_i-Protein-gekoppelter „Orphan“-Rezeptor, der ursprünglich im Jahr 1996 unter dem Namen „R12“ von Raport et al. kloniert worden war.¹²⁴ Zwei Jahre später identifizierten Bläsius et al. einen Klon „hip4“ mit einem Insert von 1741 bp, dessen „offenes Leserahmen“ (ORF) für ein Polypeptid mit 339 Aminosäuren codiert.¹²⁵ Die codierende Sequenz und Teile der 3'-untranslatierten Region (UTR) stimmten mit der von „R12“ überein. Ein weiterer Klon „fb1“ war mit „hip4“ nahezu identisch. Der Unterschied bestand nur in einem längeren 3'-UTR und einem 66 bp großen Einschub an der vermuteten Splice-Stelle des fb1-Klons. Damit codiert diese Sequenz für ein 367 Aminosäuren langes Protein, das am N-Terminus um 28 Aminosäuren länger ist als das von „hip4“. Bläsius et al. folgerten daraus, dass es sich bei den von „hip4“ und „fb1“ exprimierten Proteinen um zwei verschiedene Splice-Varianten von GPR17 handelt, was später bestätigt werden konnte.^{126,127}

1.5.2 AUFBAU DES GPR17 UND BINDUNG VON LIGANDEN

Aus der Gensequenz des Rezeptors konnte 2006 ermittelt werden, dass der GPR17 phylogenetisch sowohl mit der P2Y- als auch mit der Cysteinyl-Leukotrien-Familie (CysLT) verwandt ist (siehe Abbildung 1.11).^{128,129}

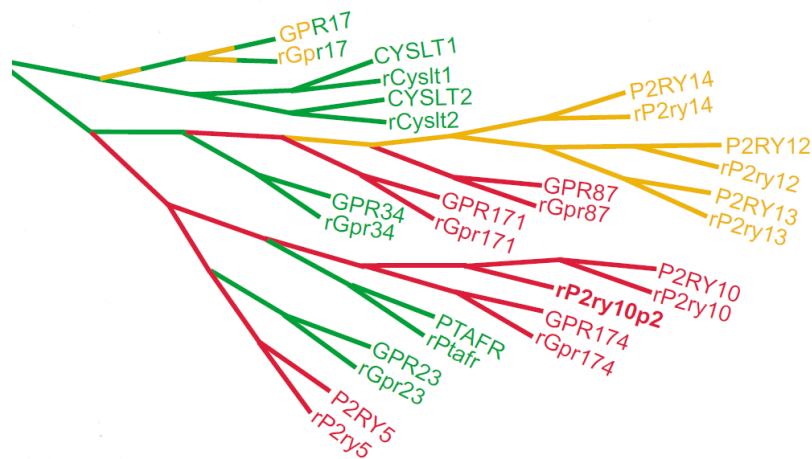


Abbildung 1.11: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der Rezeptoren der Rhodopsin-Familie. Die Liganden-Typen der Rezeptoren sind durch farbliche Unterscheidung gekennzeichnet. Rot: Waisen-Rezeptoren, Grün: Rezeptoren für Lipid-ähnliche Liganden, Gelb: Rezeptoren für Liganden mit Purin-Grundstruktur; modifiziert nach Gloriam et al.¹²⁹

Der Rezeptor ist, wie nahezu alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, aus sieben transmembranären Helices aufgebaut.^{130,131} Das Alignment der Ratten-, Mäuse- und menschlichen Aminosäuresequenzen zeigte eine große Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Spezies. Etwa 90 % der Aminosäuren stimmen überein. Ferner zeigt sich eine Konservierung eines typischen Aminosäuremotivs am Ende von Helix TM6 (H-X-X-R) (siehe Abbildung 1.12),¹³² welches in vielen GPCRs, unter anderem auch in P2Y- und CysLT-Rezeptoren enthalten ist. Es wird allgemein angenommen, dass dieses Aminosäuremotiv für die Ligandenbindung eine entscheidende Rolle spielt.

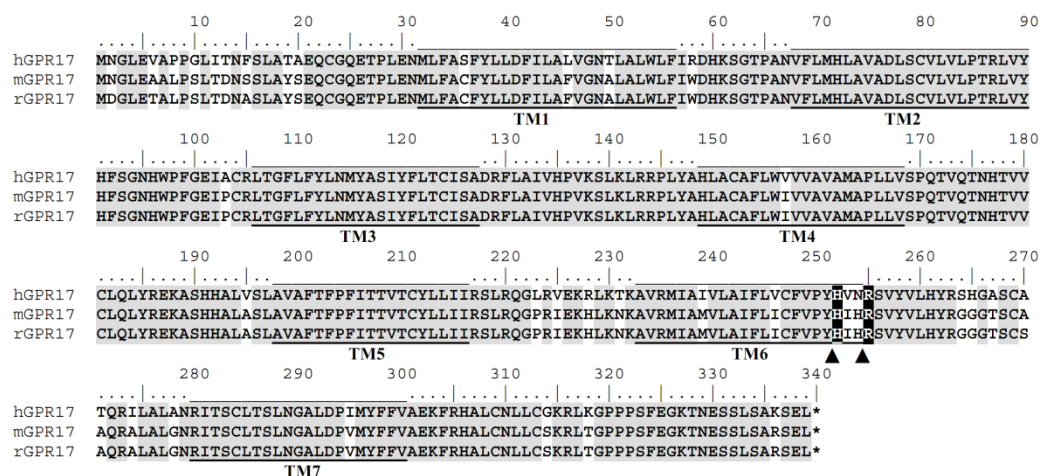


Abbildung 1.12: Alignment der humanen, Maus- und Ratten-Aminosäuresequenz des GPR17. Hervorgehoben sind die sieben transmembranären Domänen sowie das konservierte H-X-X-R-Motiv in TM6. Modifiziert nach Ciana et al.¹²⁸

Laut Parravicini et al. teilt die dritte transmembranäre Domäne den Rezeptor in zwei unterschiedlich polarisierte Regionen.¹³¹ Die Helices TM1, TM2 und TM7 bilden eine hydrophile Region, wohingegen die Helices TM4, TM5 und TM6 eine hydrophobe Umgebung definieren, in der viele aromatische Reste dominieren. Parravicini et al. postulieren weiterhin das Vorhandensein einer sogenannten „Hilfs-Bindungsstelle“, die sich im Bereich zwischen der zweiten Extrazellulärschleife, der dritten Extrazellulärschleife und dem N-Terminus befindet.¹³¹ Diese soll durch ihre Struktur vor allem kleine Liganden gezielt in die Bindungstasche führen und somit deren Bindung unterstützen.

Aufgrund der Ähnlichkeiten in Sequenz, Struktur und Vorkommen sowohl mit der P2Y-Rezeptorfamilie als auch mit der CysLT-Rezeptorfamilie besteht die Möglichkeit, dass der GPR17 auch von ihren jeweiligen endogenen Liganden aktiviert wird. 2006 publizierten Ciana et al., dass sowohl die Nucleotide UDP (**16**), UDP-Glucose (**17**) und UDP-Galactose (**18**) als auch die Cysteinylleukotriene LTC₄ (**19**) und LTD₄ (**20**) den humanen GPR17 aktivieren können (siehe Abbildung 1.13). Er soll sowohl an eine Adenylatcyclase-Inhibition als auch an eine intrazelluläre Calcium-Mobilisierung gekoppelt sein.¹²⁸ Auch am Ratten-GPR17 wurden diese Ergebnisse von der Arbeitsgruppe bestätigt; lediglich UDP-Galactose löste hier keinen Effekt aus.¹²⁸

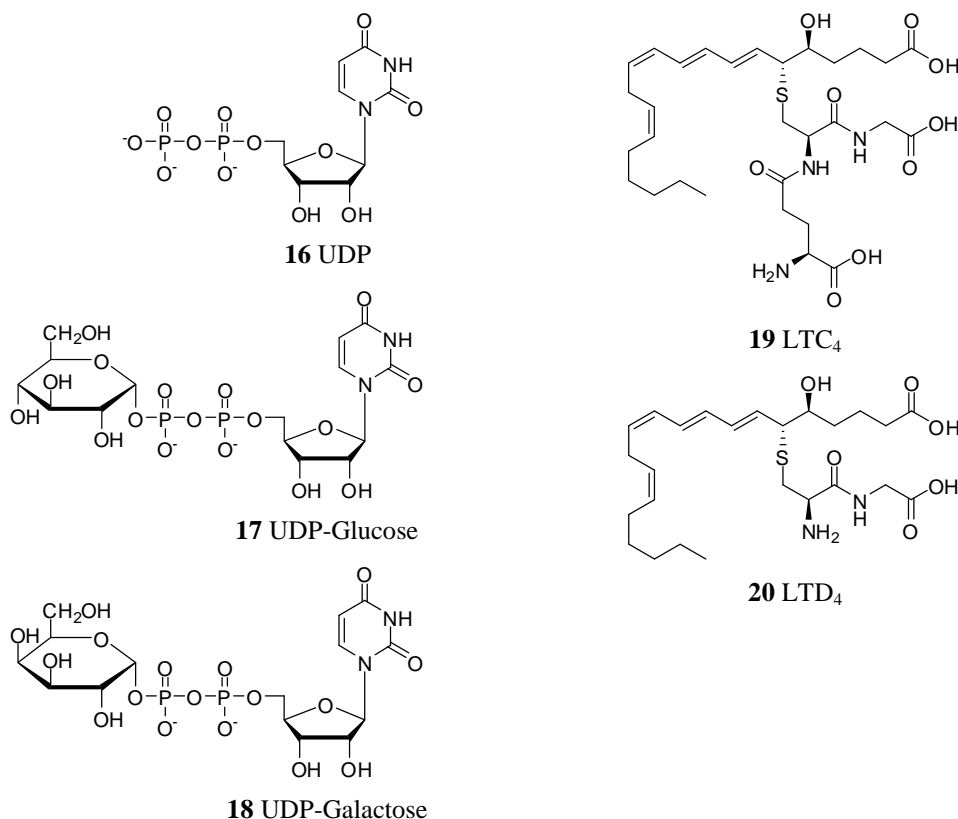


Abbildung 1.13: Strukturen der postulierten Agonisten am humanen GPR17.
Am GPR17 aus Ratten zeigte UDP-Galactose keine Aktivität.¹²⁸

Weiterhin wurde eine Hemmung des Rezeptors durch bekannte purinerge und Leukotrien-Antagonisten beschrieben. Zu diesen gehören der P2Y₁₂/P2Y₁₃-Antagonist Cangrelor (**23**)^{133,134}, der P2Y₁-Antagonist MRS2179 (**24**)¹³⁵ und die CysLT₁-Antagonisten Montelukast (**21**) und Pranlukast (**22**)^{136,137} (siehe Abbildung 1.15). Im Gegensatz dazu war der P2Y₁₂-Antagonist Ticlopidin nicht in der Lage, den Rezeptor zu hemmen.¹²⁷

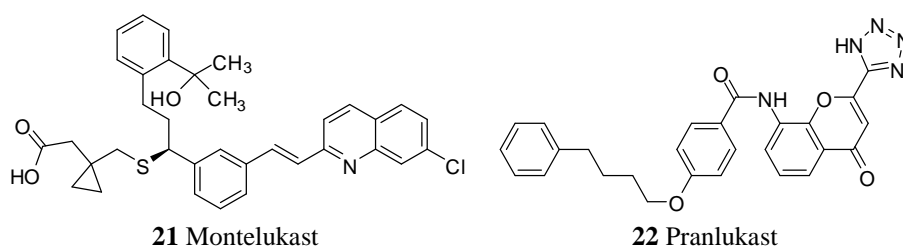


Abbildung 1.14: Strukturen der CysLT₁-Antagonisten Montelukast und Pranlukast, die als Antagonisten des GPR17 postuliert wurden.¹²⁸

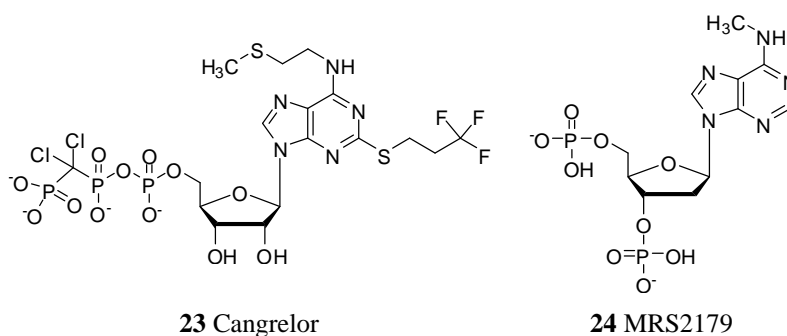


Abbildung 1.15: Strukturen der CysLT₁-Antagonisten Cangrelor und MRS2179, die als Antagonisten des GPR17 postuliert wurden.¹²⁸

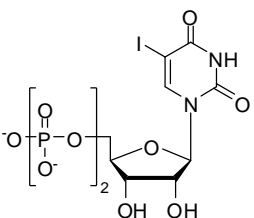
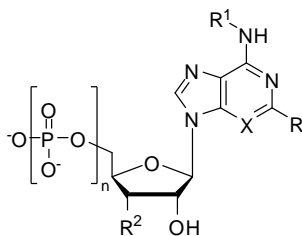
In späteren Studien identifizierten Calleri et al. durch Affinitätschromatographie und anschließende funktionelle Assays weitere Liganden (siehe Tabelle 1-9).¹³⁸

Parravicini et al. stellten die besondere Bedeutung der Aminosäure Arginin 255 für die Nucleotid-Bindung am GPR17 heraus. Im Gegensatz dazu konnte in Mutationsexperimenten gezeigt werden, dass diese Aminosäure nicht an der Bindung des Antagonisten Pranlukast beteiligt ist.¹³⁹

Allerdings konnte das von der gleichen Arbeitsgruppe publizierte Rezeptormodell die Bindung von Leukotrienen an den Rezeptor nicht erklären.¹³¹ Leukotriene als Liganden würden aufgrund ihrer Größe aus der Bindungstasche herausragen. Diese Erkenntnis steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig von einander publizierten. Qi et al. zeigten 2008, dass eine Aktivierung des GPR17 weder mit den Nucleotid-Derivaten UDP (**16**), UDP-Glucose (**17**) und UDP-Galactose (**18**) noch mit dem Leukotrien LTD₄ (**20**) möglich ist.¹⁴⁰ Gemessen wurden, analog zu der Publikation von Ciana et al., der Anstieg der IP₃-Konzentration, die Inhibition der cAMP-Ausschüttung und die Anreicherung von

intrazellulärem Calcium. Als Zellsysteme wurde HEK293- und COS-7-Zellen, die den GPR17 transient exprimierten und CHO- und 1321N1-Astrozytom-Zellen, die den Rezeptor stabil exprimierten, verwendet. In keinem dieser Experimente konnte eine Wirkung der Verbindungen auf den GPR17 festgestellt werden.¹⁴⁰

Tabelle 1-9: [³⁵S]GTPγS-Bindung neuer potentieller GPR17-Liganden; modifiziert nach Calleri et al.¹³⁸

							
25		26a-f					
Verbindung	R	R ¹	R ²	X	n	EC ₅₀ ^a	IC ₅₀ (nM) ^b
16 UDP		siehe Abbildung 1.13				1.14 ± 0.2 μM	--
24 MRS2179		siehe Abbildung 1.15				--	508 ± 29
23 Cangrelor		siehe Abbildung 1.15				--	0.7 ± 0.02
25			--			945 ± 48 nM	--
26a	Cl	H	HPO ₄ ⁻	N	2	--	582 ± 57
26b	H	CH ₃	OH	N	3	--	112 ± 7
26c	Cl	CH ₃	OH	N	3	11 ± 1 nM	--
26d	Cl	CH ₃	OH	CH	3	1.7 ± 0.1 nM	--
26e	H	cC ₅ H ₉	OH	N	3	1.4 ± 0.1 nM	--
26f	C≡C-Ph	H	OH	N	3	36 ± 3 pM	--

^amittlere effektive Konzentration (EC₅₀) bestimmt für Agonisten am GPR17; ^bmittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) für Antagonisten am GPR17, bestimmt gegen UDP-Glucose (10 μM)

In den folgenden Jahren publizierten auch Maekawa et al. (2009) sowie auch Benned-Jensen et al. (2010) ähnliche Ergebnisse.^{127,141} Beide Arbeitsgruppen konnten keine Aktivierung des GPR17 durch die Leukotriene LTC₄ (**19**) und LTD₄ (**20**) messen. Im Widerspruch zu Ciana et al.¹²⁸ stellten Maekawa et al.¹⁴¹ fest, dass GPR17 als negativer Regulator des CysLT₁-Rezeptors fungiert.

Maekawa et al. fanden ebenfalls heraus, dass auch eine Aktivierung des GPR17 mit 100 μM UDP-Glucose (**17**) nicht möglich war, Ciana et al. postulierten hingegen für UDP-Glucose (**17**) an GPR17 einen EC₅₀-Wert von 12.0 ± 1.1 μM. In neuesten Experimenten von Benned-Jensen et al. wurden die Aktivitäten der Nucleotide UDP-Glucose (**17**), UDP-Galactose (**18**) und UDP (**16**) sowohl an der kürzeren Isoform des humanen GPR17 als auch an der längeren Isoform erneut untersucht.¹²⁷ Sie ermittelten EC₅₀-Werte von 1.2 μM für die Aktivität von UDP-Glucose

(17), 0.3 μM für UDP-Galactose (18) und 1.6 μM für die Aktivität von UDP (16) an der kürzeren Isoform des GPR17. Für die längere Isoform konnte eine geringere Potenz der getesteten Liganden festgestellt werden.¹²⁷ Erst bei einer Konzentration von 100 μM konnte für die UDP-Zucker eine Aktivierung des Rezeptors gemessen werden. Damit konstatieren Benned-Jensen et al. für diese Liganden eine 50 – 170fach höhere Potenz an der kürzeren Isoform im Vergleich zur längeren. Das Nucleotid UDP (16) zeigte sogar bei einer Konzentration von 100 μM noch keine Aktivität an der längeren Form des GPR17. Dies ist im Vergleich zu anderen Rezeptoren, die in einer kürzeren und einer längeren Isoform vorkommen, recht ungewöhnlich. Isoformen, die einen kürzeren N-Terminus aufweisen, werden üblicherweise durch ihre Liganden weniger potent aktiviert als die längeren Homologe.¹²⁷ Dies konnte z. B. für den Cholezystokinin B-Rezeptor (CCKBR) nachgewiesen werden, bei dessen kürzerer Isoform der N-Terminus vollständig fehlt. Diese kürzere Isoform (ΔCCKBR) zeigte eine geringere Affinität für die Liganden Gastrin und CCK.^{142,143}

Der Mechanismus, der für die größere Potenz der kürzeren Isoform des GPR17 verantwortlich ist, ist bis heute noch unbekannt.

Die Aktivierbarkeit des GPR17 durch Nucleotide und Nucleotid-Zucker, die durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Abbraccio publiziert wurden,¹²⁸ konnten auch in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Evi Kostenis (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) nicht bestätigt werden (E. Kostenis, C.E. Müller; persönliche Mitteilung). Damit ist auch die Entwicklung neuer, potentieller Liganden für den GPR17, die von Calleri et al. publiziert wurden (siehe Tabelle 1-9), in Frage zu stellen. Die verschiedenen veröffentlichten und z. T. widersprüchlichen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der GPR17 weiterhin als Waisen-Rezeptor betrachtet werden muss.

1.5.3 EXPRESSION

In Übereinstimmung mit früheren Expressionsexperimenten¹²⁵ konnten Abbraccio et al. durch immunhistochemische Studien mit einem GPR17-Antikörper zeigen, dass sowohl der Ratten- als auch der menschliche GPR17 in Geweben, die typischerweise durch Ischämie geschädigt werden können, angereichert ist.¹²⁸ Zu diesen zählen sowohl das Gehirn als auch Organe wie die Niere und das Herz. In der Leber und der Lunge hingegen konnte nur eine geringe Expression gezeigt werden.

2010 veröffentlichten Benned-Jensen et al. eine umfassende Untersuchung der Expression der beiden Isoformen des Rezeptors in verschiedenen Geweben.¹²⁷ Sie konnten zeigen, dass beide Isoformen ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufweisen. Jedoch scheint im Gehirn die kürzere Isoform vorzuherrschen, wohingegen im Herz und in der Niere die längere Isoform in höherem Maß exprimiert wird. Möglicherweise übernehmen die beiden Isoformen damit

gewebespezifische Aufgaben.¹²⁷ Die Stärke der Expression des GPR17 im Gehirn für beide Isoformen ergibt folgende Reihenfolge: Thalamus < Hypothalamus < Kleinhirn < Amygdala < cerebellare Hemisphäre < Frontallappen < Hippocampus < Putamen.¹²⁷

Dieselbe Arbeitsgruppe konnte außerdem durch einen CREB-Assay („cAMP response element-binding protein“), zeigen, das beide Isoformen des hGPR17 die Forskolin-stimulierten CREB-Aktivität über ein $G\alpha_i$ -Protein konstitutiv hemmen können. Diese Inhibition ist abhängig von der verwendeten DNA-Menge. Der humane GPR17 soll nach den Experimenten von Benned-Jensen et al. weder an $G\alpha_s$ noch an $G\alpha_q$ koppeln.¹²⁷

Dr. Andreas Spinrath (AK Kostenis, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) hat in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe in seiner Dissertation umfassende Studien zur Kopplung des GPR17 an die verschiedenen Signalwege durchgeführt.¹⁴⁴ Dazu wurde der humane GPR17 einerseits stabil in 1321N1 Astrozytomzellen und andererseits stabil in Zellen aus Chinesischen Hamster-Ovarien (CHO-Zellen) exprimiert. In Abhängigkeit von der zellulären Umgebung konnte die Beteiligung verschiedener Signalwege festgestellt werden. In beiden Zellsystemen konnte eine Kopplung an G_i -Proteine nachgewiesen werden. In HTRF® cAMP Assays konnten in beiden Zellsystemen zusätzlich noch eine Aktivierbarkeit des G_s -Signalwegs durch GPR17-Agonisten festgestellt werden. Die Inhibition des G_i -Signalwegs ergab in Messungen der dynamischen Massen-Umverteilung (*dynamic mass redistribution*, DMR) in 1321N1-Astrozytomzellen eine Beteiligung eines noch unbekannten Signalwegs (möglicherweise $G_{12/13}$ oder β -Arrestin) und in CHO-Zellen eine Beteiligung des G_q - und eines weiteren noch nicht aufgeklärten Signalwegs. In beiden Fällen sind Phospholipase C und IP_3 -Rezeptoren, die sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befinden, an der gemessenen Calcium-Ausschüttung beteiligt. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass es nach Aktivierung des GPR17-Rezeptors in 1321N1-Astrozytomzellen, im Gegensatz zu CHO-Zellen, zu keinem messbaren Anstieg der IP_3 -Konzentration gekommen ist. Der genaue Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Rezeptors, der Rekrutierung von Phospholipase C und der IP_3 -unabhängigen Ausschüttung von Calcium konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Spinrath vermutet, dass es sich um einen bisher noch unbekannten Calcium-Mobilisierungs-Mechanismus handeln könnte.¹⁴⁴

1.5.4 PHARMAKOLOGIE

Sowohl die P2Y-Rezeptoren als auch die CysLT-Rezeptoren kommen in Geweben, die eine Entzündungsreaktion aufweisen, verstärkt vor und entzündete Zellen können häufig beide Arten von Rezeptoren ausbilden. Der GPR17, welcher sich phylogenetisch zwischen diesen beiden nicht

verwandten Rezeptoren befindet, könnte damit eine Vermittlungsstelle bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen darstellen.¹²⁸

Aalto et al. zeigten weiterhin, dass der GPR17 bei Patienten, die an einer chronisch lymphatischen Leukämie (11q-Deletion) leiden, überexprimiert ist.¹⁴⁵ Die Bedeutung des GPR17 bei dieser Erkrankung ist jedoch noch nicht bekannt.

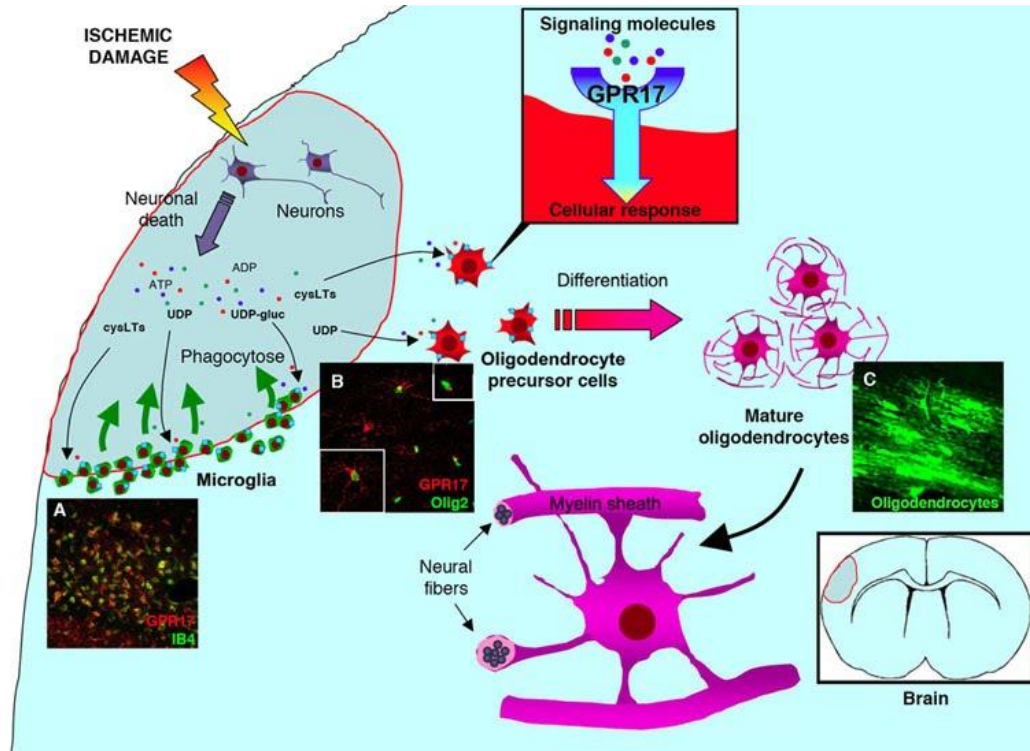


Abbildung 1.16: Schematische Darstellung der GPR17-Aktivierung nach Gehirnverletzungen. Ischämische Verletzungen führen zu neuronalem Sterben im verwundeten Gewebe (in der Abbildung durch die rote Linie begrenzt). Daraufhin werden Signalmoleküle freigesetzt, die Mikroglia-Zellen aktivieren und die Phagozytose initiieren. Dieser Prozess unterstützt den Abtransport von abgestorbenen Zelltrümmern. (A) Aktivierte Mikroglia-Zellen, angefärbt durch den spezifischen Marker IB4 in grün, die den GPR17 coexprimieren (in rot). Die Signalmoleküle induzieren weiterhin eine Differenzierung von Oligodendrozyt-Vorläufer-Zellen zu reifen Oligodendrozyten, die für die Bildung von Myelin verantwortlich sind. (B) Vorläufer-Zellen können von reifen Oligodendrozyten durch die Bildung des spezifischen nucleären Proteins Olig2 (in grün) unterschieden werden. Sowohl die Expression von Olig2 als auch die von GPR17 wird während der Myelin-Bildung herunter reguliert; modifiziert nach Lecca.¹⁴⁶

Maisel et al. stellten 2007 außerdem fest, dass das GPR17-kodierende Gen eines von drei Genen ist, das ausschließlich in adulten Neuroprogenitorzellen des Hippocampus und nicht in den entsprechenden fetalen Zellen vorkommt.¹⁴⁷ Aus diesem Grund wird vermutet, dass der GPR17 an der Reparatur von Hirnverletzungen beteiligt sein könnte. Dieser Untersuchung widmeten sich 2008 Lecca et al.¹⁴⁸ Sie zeigten, dass ca. 24 Stunden nach einer Verletzung die Expression von GPR17 transient herauf reguliert wird. Nach ca. 48 – 72 Stunden zeigt sich die Expression

von GPR17 schließlich auf Mikroglia und Makrophagen, die dann das verletzte Gewebe infiltrieren. Zeitgleich proliferieren auch GPR⁺ Oligodendrozyt-Vorläufer in der die Verletzung umgebenden Region und bilden damit ausgereifte Oligodendrozyten (siehe Abbildung 1.16). Ergänzt wurde diese Arbeit durch Ceruti et al., die die Rolle von GPR17 bei einer Verletzung des Rückenmarks untersuchte.¹⁴⁹ In noch nicht verletztem Gewebe wird GPR17 vor allem in Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert. Durch die Verletzung des Rückenmarks wird ein massives Zellsterben ausgelöst. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass sich die Zahl der GPR17-exprimierenden Zellen erhöht. Dies muss also durch eine neue Population von Zellen zustande kommen, die ebenfalls GPR17 exprimieren. Nach der Verletzung konnte schließlich gezeigt werden, dass fast alle Mikroglia-Zellen und Makrophagen, die das verletzte Gewebe infiltrieren, GPR17 exprimieren. Wenn diese Prozesse abgeschlossen sind, wird der GPR17 scheinbar nicht mehr benötigt und die Expression herunter reguliert.

Die Expression von GPR17 durch Oligodendrozyten legt ferner eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Bildung der Myelinscheiden nahe. Eine Demyelinisierung führt zur Unterbrechung der saltatorischen Nervenleitung und damit zu Krankheiten wie Multipler Sklerose oder Leukodystrophien. Bei gesunden Menschen bilden sich im embryonalen Stadium Oligodendrozyt-Vorläufer-Zellen (OPCs), die jedoch noch kein Myelin bilden. Erst nach der Geburt reifen diese Zellen zu Oligodendrozyten heran, die dann die Myelinisierung induzieren. Chen et al. untersuchten daher die Expression des GPR17 in verschiedenen Zeiträumen nach der Geburt, in Knockout- sowie GPR17-überexprimierenden Mäusen.¹⁵⁰ Sie konnten zeigen, dass in den ersten sieben Tagen nach der Geburt die Expression von GPR17 ansteigt und erst nach ca. 14 Tagen wieder abnimmt. Eine drastische Abnahme ist ab dem 21. Tag zu beobachten. Dies ist der Zeitpunkt, zu dem die Myelinisierung postnatal einsetzt.

In GPR17-überexprimierenden, transgenen Mäusen war die Myelin-Bildung im ZNS inhibiert. Die Mäuse zeigten eine verminderte Immunreaktivität im Corpus callosum als Resultat der Reduktion der reifen Oligodendrozyten. Die meisten Mäuse starben bereits ca. 3 Wochen nach der Geburt. Im Gegensatz dazu zeigten GPR17^{-/-}-Mäuse eine beschleunigte Differenzierung von Oligodendrozyt-Vorläuferzellen und damit auch eine beschleunigte Myelinisierung. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass GPR17 als zell-intrinsicher Schalter der Myelinisierung agiert.¹⁵⁰

Daniele et al. untersuchten die Rolle des GPR17 in Neuronen. Dabei verwendeten sie Phäochromozytom-Zellen aus Ratten, die ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung neuronaler Differenzierung unter Einfluss von Wachstumsfaktoren darstellen.¹⁵¹ Im Gegensatz zu Chen et al. konnte diese Arbeitsgruppe eine geringe aber messbare Expression des GPR17 in adulten Neuronen feststellen. Sie postulieren, dass der GPR17 vor allem während der Entwicklung exprimiert wird, im adulten Lebewesen dann herunter reguliert wird und unter bestimmten Er-

krankungszuständen wieder aktiviert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass UDP-Glucose und LTD₄ das Überleben der Zellen selektiv begünstigen. Diese Resultate wurden durch den Einsatz von small-interfering-RNAs (siRNAs) und des GPR17-Antagonisten Cangrelor bestätigt. Da der GPR17-Antagonist Montelukast selbst ebenfalls eine zelltoxische Wirkung besitzt, konnte dieser für die Versuche nicht eingesetzt werden. Die Verwendung von GPR17-Agonisten bewirkte auch ohne Wachstumsfaktoren eine Zelldifferenzierung. GPR17-Agonisten könnten somit eine neurotrophe Wirkung besitzen.¹⁵¹

Nachdem Maekawa et al. festgestellt hatten, dass der GPR17 als negativer Regulator des CysLT₁-Rezeptors fungiert¹⁴¹, untersuchten sie anschließend den Einfluss eines GPR17-Knockouts (GPR17^{-/-}), eines CysLT₁-Knockouts (CysLT₁^{-/-}) und eines GPR17-CysLT₁-Doppelknockouts (GPR17/CysLT₁^{-/-}) in Mäusen mit Lungenentzündung.¹⁵² Dazu wurden die entsprechenden Knockout-Mäuse mit einem Extrakt aus Hausstaubmilben (*Dermatophagoides farinae*; „df“) sensibilisiert. Maekawa et al. konnten zeigen, dass ein Knockout des GPR17 zu einer erhöhten Expression des CysLT-Rezeptors führt, und dass diese unter der Sensibilisierung durch df besonders ausgeprägt ist. Außerdem ist die Expression der Interleukine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-17A in GPR17^{-/-}-Mäusen erhöht und die des γ -Interferons verringert. Diese Effekte konnten weder in den CysLT₁^{-/-}- noch in den GPR17/CysLT₁^{-/-}-Mutanten beobachtet werden. Die GPR17/CysLT₁^{-/-}-Doppelmutanten waren sogar gänzlich vor einer Lungenentzündung geschützt.¹⁵²

Die bisher veröffentlichten Publikationen zeigen die besondere Bedeutung des GPR17 auf. Eine gezielte Aktivierung und Desaktivierung durch verschiedene Liganden (Agonisten und Antagonisten) könnte bei der Behandlungen von Entzündungskrankheiten sowie bei Krankheiten des zentralen Nervensystems von großem Nutzen sein.

2 ZIEL DER ARBEIT

Adenosin ist ein endogener Modulator verschiedener physiologischer Prozesse, die durch die Familie der Adenosin-Rezeptoren vermittelt werden. Ein Mitglied dieser Familie ist der A₁-Rezeptor. Aufgrund seiner weitverbreiteten Expression im Körper (siehe Tabelle 1-3) stellt er eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Durch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können Rezeptoren *in vivo* sichtbar gemacht werden. Dadurch ist eine genaue Untersuchung von Rezeptoren unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen möglich. Eine Entwicklung von PET-Liganden zur Untersuchung des A₁-Rezeptors wird seit 1995 verfolgt. Wie in Kapitel 3.7 dargestellt werden wird, sind jedoch bisher nur antagonistische PET-Liganden zur Untersuchung des A₁-Rezeptors synthetisiert worden. Diese zeigen im Allgemeinen eine schlechte Wasserlöslichkeit, die die Applizierbarkeit der Liganden erschwert. Außerdem zeigen sie in einigen Fällen eine hohe unspezifische Bindung, vor allem in peripherem Gewebe. Abgesehen von [¹⁸F]CPFPX sind ferner bisher alle bekannten Verbindungen mit dem Radioisotop ¹¹C markiert. Die kurze Halbwertszeit von nur 20 min machen eine Verwendung in metabolischen Untersuchungen, die länger als ein paar Halbwertszeiten dauern, oder einen Transport der Diagnostika unmöglich. Nucleosid-Derivate könnten als agonistische PET-Liganden diese Nachteile umgehen. Im Allgemeinen zeigen sie nicht nur eine verbesserte Wasserlöslichkeit, sondern auch eine geringere unspezifische Bindung. Die Verwendung von ¹⁸F als Positronenemitter bringt außerdem weitere Vorteile. Die geringe Positronenenergie gewährt eine gute Auflösung der Bilder und die lange Halbwertszeit ermöglicht auch komplexere Synthesen, längere Untersuchungszeiten und einen kommerziellen Transport in Labore, die keine eigenen Positronenemitter herstellen können.¹⁵³ Ein besonderer Vorteil bei der Verwendung von Agonisten als PET-Liganden wäre außerdem die selektive Markierung funktioneller Rezeptoren. Aus diesem Grund befasst sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit mit der Synthese eines geeigneten agonistischen PET-Ligand-Vorläufers, der in Kooperation mit der Abteilung „Nuklearchemie“ am Institut für Neurowissenschaften und Medizin des Forschungszentrums Jülich radioaktiv fluoriert werden soll.

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Charakterisierung des Waisenrezeptors GPR17. Wie in Kapitel 1.5 dargestellt, handelt es sich beim GPR17 um einen Rezeptor, dessen Sequenz im Rahmen des 1990 begonnenen Humanen Genomprojekts aufgeklärt wurde. Die phylogenetische Einordnung zwischen die P2Y- und die Cysteinyl-Leukotrien-Familie (CysLT), die 2006 von Ciana et al. vorgenommen wurde, löste eine vermehrte Suche nach potentiellen endogenen und synthetischen Liganden des Rezeptors aus. Aufgrund der Ähnlichkeiten in Sequenz, Struktur und Vorkommen sowohl mit der P2Y-Rezeptorfamilie als auch mit der CysLT-Rezeptorfamilie,

publizierten Ciana et al. 2006, dass sowohl die Nucleotide UDP (**16**), UDP-Glucose (**17**) und UDP-Galactose (**18**) als auch die Cysteinylleukotriene LTC₄ (**19**) und LTD₄ (**20**) den humanen GPR17 aktivieren können. Weiterhin wurde eine Hemmung des Rezeptors durch bekannte purinerge und Leukotrien-Antagonisten beschrieben. Zu diesen gehören der P2Y₁₂/P2Y₁₃-Antagonist Cangrelor (**23**),^{133,134} der P2Y₁-Antagonist MRS2179 (**24**)¹³⁵ und die CysLT₁-Antagonisten Montelukast (**21**) und Pranlukast (**22**).^{136,137} Die Aktivierbarkeit des GPR17 durch Nucleotide und Nucleotid-Zucker, die durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Abbraccio publiziert wurden,¹²⁸ konnten sowohl in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Evi Kostenis (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe (Dissertation von Dr. Andreas Spinrath) als auch in verschiedenen anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 1.5.2). Im Rahmen eines Screening-Programmes der Arbeitsgruppe Kostenis (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) wurde schließlich 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**98**) als synthetischer Agonist am GPR17-Rezeptor identifiziert (AG Kostenis, unpublizierte Daten). Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Indol-2-carbonsäure-Derivate sowie das Xanthin-Derivat 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**), welches eine Analogie zur Leitstruktur aufweist, synthetisiert werden, um die Struktur-Wirkungsbeziehungen genauer untersuchen zu können und um möglicherweise Antagonisten zu identifizieren.

Die durch die Modifikation der Leitstruktur erhaltenen Verbindungen ermöglichen nicht nur die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen am GPR17, sondern können auch als pharmakologische Werkzeuge einen wesentlichen Beitrag zur Untersuchung des GPR17 leisten und darüber hinaus als potentielle Wirkstoffe zur Behandlungen von Krankheiten z.B. des Zentralen Nervensystems, von großem Nutzen sein.

3 SYNTHESE VON A₁-AGONISTEN FÜR DEN EINSATZ IN DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE (PET)

3.1 DIE POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist eine szintigraphische Technik der Nuklearmedizin zur Beurteilung physiologischer und biochemischer Prozesse *in vivo*.¹⁵⁴ Grundlage der PET ist die Darstellung der Verteilung einer radioaktiv markierten Substanz (Radiopharmakon bzw. Tracer) im Organismus.¹⁵⁴ Tracer sind Substanzen, die durch den Einbau von Radionucliden markiert sind. Die verwendeten Radionuclide sind Positronenemitter. Diese besitzen einen Überschuss an Protonen im Kern. Dieser Protonenüberschuss destabilisiert den Kern, der sich durch die Abgabe eines Positrons – also eines positiv geladenen Elektrons – sowie eines Neutrinos wieder stabilisiert.¹⁵⁵ Die verfügbare Gesamtenergie, die durch den Zerfall entsteht, wird zwischen Positron und Neutrino aufgeteilt. Positronen besitzen also ein kontinuierliches Energiespektrum mit einem Maximum, das von dem spezifischen Radioisotop abhängt. Typischerweise liegen diese Werte im Bereich zwischen einigen Kiloelektronenvolt und einigen Megaelektronenvolt. Das freigewordene Positron bewegt sich nun durch den Raum und gibt dabei kinetische Energie an das umgebende Material ab.¹⁵⁵ Die Entfernung, die ein Positron nach seinem Freiwerden zurücklegt, wird als „Positronen-Reichweite“ bezeichnet und ist direkt abhängig von der Energie des Positrons. Je größer die Positronenenergie, desto größer ist die Distanz, die es zurücklegen kann.¹⁵³ Nachdem es zur Ruhe gekommen ist, üblicherweise nach einigen Millimetern, interagiert es mit einem Elektron. Durch diese sogenannte Annihilation werden zwei γ -Photonen mit einer Energie von 511 keV frei, die sich in einem Winkel von 180° voneinander entfernen.¹⁵³ Die dabei resultierende Strahlung bezeichnet man als Vernichtungsstrahlung. Diese kann detektiert werden, wenn zwei γ -Quanten nahezu gleichzeitig auf den Detektor treffen (Koinzidenz-Messung) und sie dient der ungefähren Lokalisation des Positronenemitters. Der genaue Ort der Positronenfreisetzung ist aufgrund der Positronen-Reichweite dabei unbekannt. Es werden folglich Elemente mit einer geringen Positronenenergie bevorzugt, bei denen der Ort der Annihilation nahezu mit dem Ort der Positronenfreisetzung übereinstimmt.¹⁵³

Der wichtigste Teil des Positronen-Emissions-Tomographen ist der Detektor, der meist ringförmig den Körper umschließt und aus einzelnen Szintillatorkristallen besteht (siehe Abbildung 3.1). Diese werden durch die Annihilations-Photonen angeregt. Bei der Rückkehr in den Grundzustand werden sichtbare Lichtblitze frei, die dann in einem Sekundärelektronenvervielfacher verstärkt und anschließend in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Charakteristisch für Szintillationskristalle sind die hohe Massendichte und Atomzahl, die große Lichtausbeute und

das schnelle Ansprechen auf die γ -Quanten.¹⁵⁵ Die ersten PET Tomographen, die in den 1970er Jahren entwickelt wurden, verwendeten Thallium-dotierte Natriumiodid-Kristalle. Seit dieser Zeit wurden die Detektionskristalle kontinuierlich verbessert. Seit den 1990er Jahren werden vor allem Cer-dotierte Lutetiumoxyorthosilikate (LSO) und Cer-dotierte Gadoliniumoxyorthosilikate (GSO) verwendet, die eine höhere Lichtfreisetzung und eine schnellere Reaktion auf die γ -Quanten als die Szintillationskristalle der ersten Generation besitzen.¹⁵⁶

Die gemessenen Daten werden anschließend durch verschiedene Computeroperationen korrigiert. Dabei müssen vor allem die Signale der zufällig auf den Detektor auftreffenden γ -Quanten subtrahiert werden, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Aus den korrigierten Daten können schließlich ein Schnittbild und ein dreidimensionales Modell berechnet werden (siehe Abbildung 3.1). Aktuelle PET-Systeme erlauben eine räumliche Auflösung von 5 - 7 mm und eine zeitliche Auflösung von einigen Sekunden pro Bild.¹⁵⁴

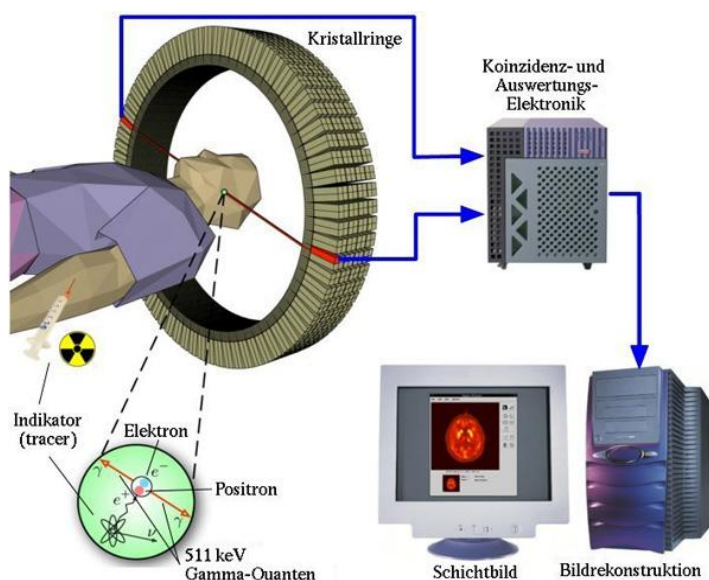


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Positronen-Emissions-Tomographie.¹⁵⁷

3.2 RADIONUCLIDE FÜR DIE PET-TECHNIK

Für die Markierung von Tracern verwendet man in der PET unter anderem die Nuclide ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O . Diese sind gut geeignet, da bioorganische Moleküle hauptsächlich aus diesen Elementen zusammengesetzt sind. Damit ermöglichen sie die Synthese von Radiopharmazeutika, die chemisch von ihren nicht-radioaktiven Gegenstücken nicht unterscheidbar sind.¹⁵³ Abgesehen von einem vernachlässigbaren Isotopeneffekt, besitzen diese radioaktiven Pharmazeutika die gleichen physikochemischen und biochemischen Eigenschaften wie die nicht-markierten Verbindungen.

Die Markierung mit ^{18}F hingegen stellt meist eine nichtisotope Substitution dar. Der Austausch eines Wasserstoffatoms oder einer Hydroxygruppe durch ein Fluoratom ist jedoch eine der häufigst angewendeten bioisosteren Austauschvarianten.¹⁵³ Die sterischen Eigenschaften eines Moleküls, bei dem Wasserstoff gegen Fluor ausgetauscht wurde, unterscheiden sich kaum. Der starke elektronenziehende Effekt des Fluors verändert jedoch die elektronischen und biologischen Eigenschaften sowie die Lipophilie des Moleküls.¹⁵³

Von allen Positronenemittern, die für die PET-Technik verwendet werden, besitzt ^{18}F die vorteilhaftesten physikalischen Eigenschaften (siehe Tabelle 3-1). Die geringe Positronenenergie gewährt eine gute Auflösung der Bilder und die lange Halbwertszeit ermöglicht auch komplexere Synthesen, längere Untersuchungszeiten und einen kommerziellen Transport in Labore, die keine eigenen Positronenemitter herstellen können.¹⁵³

Tabelle 3-1: Eigenschaften einiger Positronenemitter.¹⁵⁵

Isotop	$t_{1/2}$ [min]	E_{max} [MeV]	Reichweite in Wasser max. [mm]	\varnothing [mm]	Produktions- prozess	Target- Füllung
^{11}C	20,4	0,96	4,1	1,1	$^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)$	$\text{N}_2(\text{O}_2)$
^{13}N	9,96	1,19	5,1	1,5	$^{16}\text{O}(\text{p},\alpha)$	H_2^{16}O
^{15}O	2,03	1,73	7,3	2,5	$^{14}\text{N}(\text{d},\text{n})$	$\text{N}_2(\text{O}_2)$
^{18}F	109,8	0,63	2,4	0,6	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})$	H_2^{18}O , $^{18}\text{O}_2/\text{F}_2$
^{68}Ga	68,3	1,89	8,2	2,9	Generatornuclid	
^{82}Rb	1,25	3,40	14,1	5,9	Generatornuclid	

Abkürzungen: p = Proton; α = α -Teilchen; d = Deuteron; n = Neutron

Die Positronenstrahler ^{68}Ga und ^{82}Rb werden als Generatormoleküle erzeugt. Dafür werden die Muttermoleküle ^{68}Ge bzw. ^{82}Sr über eine Hochenergiekernreaktion hergestellt.¹⁵⁸ Die Herstellung der Positronenstrahler ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N und ^{18}F erfolgt an kleinen Zyklotronen mit Teilchenenergien von < 20 MeV bei Protonen und < 10 MeV bei Deuteronen.¹⁵⁸ Auf die Herstellung des Positronenstrahlers ^{18}F wird im Folgenden genauer eingegangen.

Es werden zwei unterschiedliche Targets verwendet, um zwei verschiedene Arten von radioaktivem Fluor herzustellen. Die Standardmethode zur Herstellung von ^{18}F als nucleophiles Fluoridion ($^{18}\text{F}^-$) (siehe Kapitel 3.3) verwendet ein flüssiges Target (meist H_2^{18}O), welches mit Protonen beschossen wird (siehe Abbildung 3.2).¹⁵⁸ Der nötige Aufbau besteht aus zwei Titanfilmen in einem ebenfalls aus Titan gebildeten System. Der Raum zwischen den beiden Folien beträgt ca. 3,5 mm und ist mit einem Volumen von 1,3 ml angereichertem Wasser gefüllt.¹⁵⁸ Nach dem Beschuss des Wassers mit Protonen wird ein Neutron abgespalten ($^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})$ -Reaktion). Das Wasser wird anschließend durch eine bis zu 50 m lange Kapillare aus Polypropylen in

eine Bleizelle geleitet. Die Ausbeute beträgt > 90 %. Die erreichte spezifische Aktivität liegt bei < 1,5 Ci/μmol.¹⁵⁸

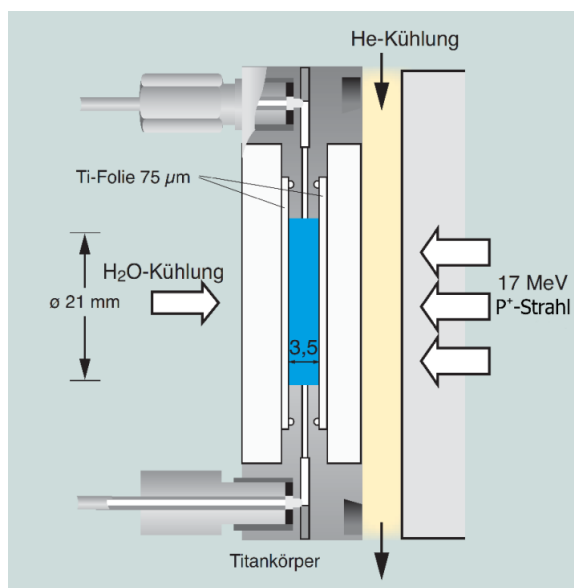


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines Mitteldruck-Wasser-Targets zur Produktion von ^{18}F über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})$ -Reaktion. Der Aufbau besteht aus zwei Titanfolien, die mit einem Titankörper durch Elektronenstrahlschweißen verbunden sind und als vorderes und hinteres Fenster des Targets fungieren. Der Hohlraum zwischen den Folien, der mit H_2^{18}O gefüllt ist, hat ein Volumen von 1,3 ml bei einer Schichtdicke von 3,5 mm; modifiziert nach Qaim.¹⁵⁸

Zur Herstellung von ^{18}F als elektrophile Fluorgas ($[^{18}\text{F}]\text{F}_2$) (siehe Kapitel 3.3) wird stattdessen ein Gas-Target (meist ^{20}Ne oder $^{18}\text{O}_2$) verwendet.¹⁵⁸ Dieses wird mit Deuteronen beschossen. Die Entfernung des Gases aus dem Target erfordert eine geringe Menge elementaren Fluors, sodass eine geringere spezifische Aktivität erreicht werden kann (< 0,015 Ci/μmol) als durch die Herstellung mit Wassertargets.^{158,159}

Die Synthese der Positronenemitter ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O verläuft analog der oben beschriebenen Methoden unter Verwendung entsprechender Targets (siehe Tabelle 3-1).

3.3 STRATEGIEN DER ^{18}F -RADIOMARKIERUNG

Wie bereits erwähnt, ist ^{18}F der wichtigste Positronenemitter für die Positronen-Emissions-Tomographie. Seine lange Halbwertszeit ermöglicht auch komplexe Synthesen. Um vielfältige Radiopharmazeutika herstellen zu können, kann man die Vorstufen sowohl elektrophil als auch nucleophil markieren.

Für die elektrophilen Reaktionen benötigt man elementares $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Gas. Dieses wird aufgrund seiner großen Reaktivität zunächst in selektivere und weniger reaktive Verbindungen wie

Acetylhypofluorid, Xenondifluorid, Fluorsulfonamid und andere Verbindungen umgewandelt (siehe Abbildung 3.3).¹⁵³

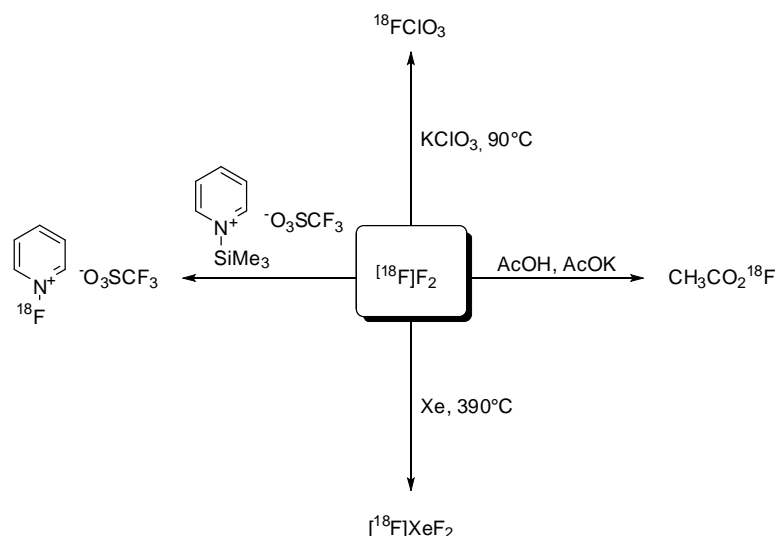


Abbildung 3.3: Synthese einiger elektrophiler ¹⁸F-markierter Reagenzien; modifiziert nach Ametamey.¹⁵³

Die radiochemische Ausbeute von Reaktionen, die mit elektrophilem ¹⁸F₂-Gas durchgeführt werden, kann maximal 50 % betragen. Dies liegt daran, dass nur eines der beiden Fluoratom des Gases ein ¹⁸F-Atom ist. Eine weitere Einschränkung ist die geringe spezifische Aktivität des ¹⁸F-markierten Produktes. Dadurch können diese Produkte nicht für die Untersuchung von sättigbaren Rezeptoren im Gehirn verwendet werden.¹⁵³

Aus diesem Grund finden nucleophile Synthesen zur Markierung eine häufigere Anwendung. Da das Fluoridion in wässrigen Medien aufgrund seiner Ladungsdichte große Solvathüllen ausbildet und durch acide Protonen schnell protoniert wird, ist es ein schlechtes Nucleophil. Daher müssen Reaktionen, die nucleophiles ¹⁸F⁻ verwenden unter absolutem Ausschluss von Wasser durchgeführt werden.¹⁵³ Diese nucleophilen Substitutionen erfolgen mehrheitlich in dipolaren, aprotischen Lösungsmitteln, da sie dissozzierend auf Salze wirken, indem sie das Kation solvatisieren, mit dem [¹⁸F⁻] aber kaum wechselwirken.¹⁶⁰

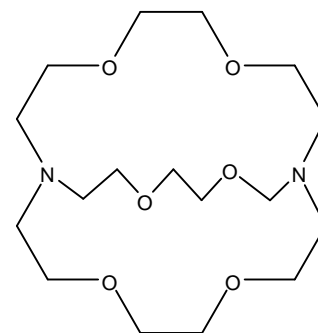


Abbildung 3.4: [2.2.2]Kryptand.

Ferner kann durch den Zusatz von Phasentransferkatalysatoren die Solvation der Kationen weiter begünstigt werden. Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung des Fluoridions.¹⁶⁰ Als Phasentransferkatalysatoren kommen hauptsächlich Aminopolyether als Kryptanden in Kombination mit Alkalisalzen oder Tetra-*n*-butylammoniumkationen – meist in Form von Carbonaten, Hydrogencarbonaten oder Hydroxiden zum Einsatz.¹⁵³ Der gebräuchlichste Kryp-

tand ist Kryptofix® 222 (siehe Abbildung 3.4). Die dreidimensionale Komplexierung des Kations führt praktisch zu einem „nackten“ Fluoridion. Dieses weist eine sehr ausgeprägte Nucleophilie auf.¹⁶⁰ Nucleophile aliphatische Fluorierungen unterliegen einem S_N2-Mechanismus. Als Abgangsgruppen werden unter anderem Bromid-, Iodid-, Tosylat-, Nosylat- oder Sulfonatreste verwendet.¹⁵³ Auch wenn die theoretische spezifische Radioaktivität für ¹¹C größer ist als für ¹⁸F, wird in der Praxis dieser Wert nie erreicht. Dies liegt daran, dass es in ¹¹C-markierten Verbindungen zu einer isotopen Verdünnung durch Lösungsmittel und Reagenzien kommt. Da Fluor in der Natur nur in sehr geringem Ausmaß vorkommt, erfolgt die isotope Verdünnung von ¹⁸F-markierten Verbindungen seltener.

3.4 VORAUSSETZUNGEN FÜR PET-TRACER

Die Eigenschaften, die ein Radiopharmakon besitzen muss, hängen eng von der Verwendung der Verbindung ab. Damit ein PET-Tracer *in vivo* eingesetzt werden kann, müssen einige Kriterien erfüllt sein. Zunächst sollte der Ligand natürlich eine **gute Affinität und Selektivität** für den gewünschten Rezeptor aufweisen.¹⁶¹ Als ein Maß dafür wird auch das *In-vitro*-Verhältnis der Bindungsstellen zur Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (B_{\max}/K_d) - auch „Bindungspotential“ genannt - verwendet.¹⁵³ Soll der PET-Tracer für Untersuchungen des Gehirns eingesetzt werden, gilt es zu bedenken, dass die Anzahl der Bindungsstellen meist gering ist (Nano- bis Femtomol pro Milligramm Gewebe). Die radioaktiv markierten Verbindungen müssen deshalb besonders hochaffin sein. Außerdem müssen PET-Radiopharmaka mit einer **hohen spezifischen Radioaktivität** synthetisiert werden. Dies ist notwendig, da nur ein kleiner Anteil der vorhandenen Bindungsstellen besetzt werden soll. Eine geringere spezifische Radioaktivität könnte sonst eine signifikante Sättigung der Bindungsstellen erfordern und damit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtern.¹⁵³ Da PET nicht zwischen Signalen des ursprünglichen Radioliganden und seinen Metaboliten unterscheiden kann, ist es ferner wichtig, dass PET-Liganden während der Messung **nicht metabolisiert werden** bzw. die Metabolite die PET-Messung nicht negativ beeinflussen.¹⁵³ Üblicherweise werden deshalb die entsprechenden Verbindungen vorab mit Blutproben inkubiert und anschließend durch HPLC untersucht. Ein guter PET-Ligand sollte möglichst zu maximal 80 % metabolisiert werden.¹⁵³ Der verwendete PET-Ligand und seine potentiellen Abbauprodukte dürfen nicht toxisch sein. Eine typische PET-Messung dauert ca. 30 Minuten. Damit der PET-Ligand anschließend möglichst schnell aus dem Körper ausgeschieden wird, ist eine **geringe Bindung an Plasmaproteine** vorteilhaft.¹⁵³ Für PET-Liganden, die zu Untersuchungen des Gehirns eingesetzt werden sollen, muss die radioaktiv markierte Verbindung schließlich in der Lage sein, die **Blut-Hirn-Schranke** zu überwinden.^{153,161} Um abschätzen zu können, ob eine Verbindung die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, müssen zwei Faktoren betrachtet werden. Zunächst ist die Bildung von Wasserstoffbrücken mit Wasser von Bedeu-

tung.¹⁵³ Generell sollte die Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken so gering wie möglich sein. Als allgemeine Regel gilt eine Anzahl von weniger als acht bis zehn Wasserstoffbrücken pro Verbindung.¹⁵³ Weiterhin sollte das Molekulargewicht der Verbindung 400-600 g/mol nicht übersteigen.¹⁵³ Eine erste gute Einschätzung, ob eine Substanz die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, gibt der Oktanol:Wasser-Verteilungskoeffizient P . Sein negativer logarithmierter Wert $\log P$ sollte etwa zwischen 2 und 3,5 liegen.¹⁵³ Verbindungen, deren Wert unterhalb von 2 liegen, können häufig die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Verbindungen mit einem höheren $\log P$, also sehr lipophile Verbindungen, zeigen dagegen im Allgemeinen eine hohe unspezifische Bindung.

3.5 PET/CT-TECHNIK

Die größte Einschränkung in der Verwendung der Positronen-Emissions-Tomographie ist die geringere Auflösung der Bilder im Vergleich zur Computertomographie oder zur Magnetresonanztomographie. Viele anatomische Details sind in den PET-Bildern nur unzureichend erkennbar. Aus diesem Grund gibt es seit den 1990er Jahren Tomographen, welche Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie gemeinsam in einer einzigen Untersuchung durchführen können. Dadurch konnten die Untersuchungszeiten im Vergleich zum Standard-PET-Verfahren entscheidend verringert werden.¹⁵⁵

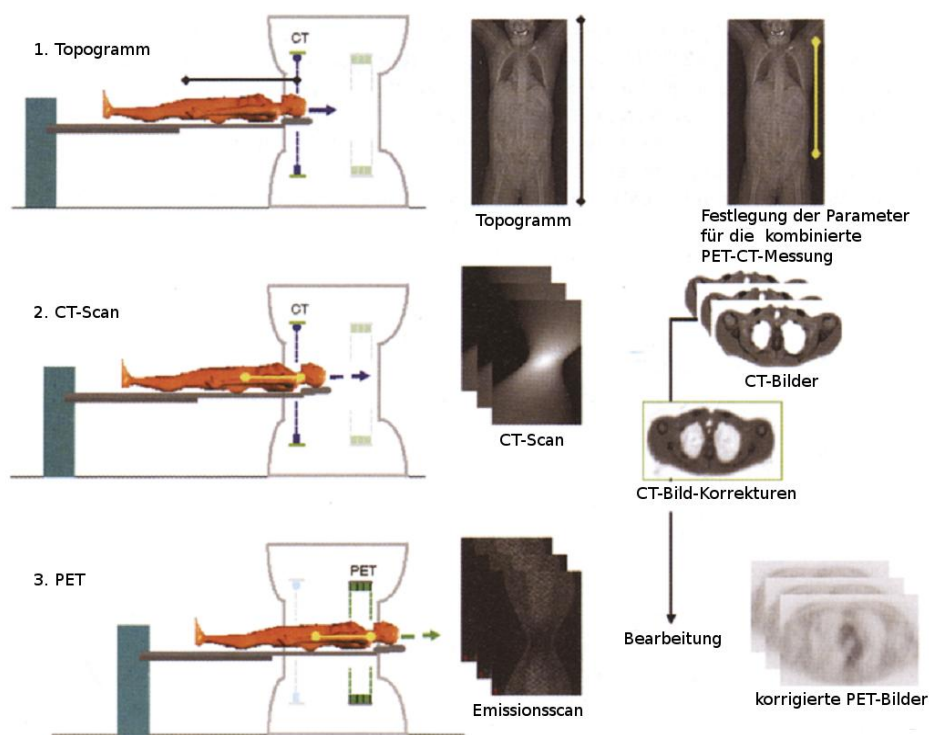


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer typischen PET/CT-Untersuchung; modifiziert nach Martínez et al.¹⁵⁵

Nach der Verabreichung eines Radiopharmazeutikums wird der Patient auf dem Scanner-Bett positioniert und es wird ein Lokalisierungsscan (Topogramm) durchgeführt (siehe Abbildung 3.5). Dieser dient zur Bestimmung des Untersuchungsbereichs. Als nächstes wird der Patient nacheinander in die Positionen zum CT- und zum PET-Scannen gefahren. Die erhaltenen Bilder werden bearbeitet und korrigiert.¹⁵⁵

3.6 KLINISCHER EINSATZ DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE

Der am häufigsten angewendete PET-Tracer ist 2-[¹⁸F]Fluor-2-desoxy-D-glucose ([¹⁸F]-FDG), das in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals synthetisiert wurde. Es wird zur Messung des Glucoseverbrauchs von Zellen in verschiedensten Bereichen angewendet. Dabei macht man sich zunutze, dass das Fluor-Derivat der Glucose in der Glycolyse nicht vollständig umgesetzt werden kann und man dadurch ein "Trapping" erreicht. Zellen, die einen hohen Glucoseverbrauch haben, reichern damit viel [¹⁸F]-FDG an und können durch Positronen-Emissions-Tomographie identifiziert werden. Tabelle 3-2 zeigt einen Überblick über die Indikationen, die mit der PET-Technik heutzutage untersucht werden und die dafür geeigneten Indikatorsubstanzen.

Tabelle 3-2: Indikationen für die PET und PET/CT und geeignete Indikatorsubstanzen.¹⁶²

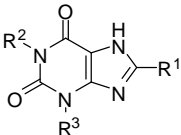
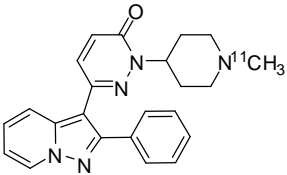


Fachbereich	Indikation	PET-Ligand
Onkologie	»Standard-PET«, am häufigsten eingesetzt	[¹⁸ F]2-Fluor-2-deoxy-D-glucose ([¹⁸ F]FDG)
	Skeletale Malignome	[¹⁸ F]Fluor
	Prostatakarzinom (Nachsorge)	[¹¹ C]Cholin
	Einige FDG-negative Tumore	O-(2-[¹⁸ F]Fluoroethyl)-L-tyrosin ([¹⁸ F]FET)
	Tumorphypoxie (z. B. vor einer Bestrahlungstherapie)	[¹⁸ F]Fluoromisonidazol ([¹⁸ F]FMISO)
Entzündung	Suche nach Entzündungsherden	[¹⁸ F]FDG
Herz	Myokardiale Vitabilitäts-Diagnostik	[¹⁸ F]FDG oder ⁸² Rb oder [⁶² Cu]Pyruvaldehyd-bis[N ⁴ -thiosemicarbazon] (PTSM)
	Myokardiale Perfusion	H ₂ ¹⁵ O oder ¹³ NH ₃
	Myokardiale Funktion, dynamische Aufnahme	[¹⁸ F]FDG
Neurologie	Neurodegeneration	[¹⁸ F]FDG
	Gehirntumore	[¹⁸ F]FDG oder ([¹⁸ F]FET)
	Epilepsie	[¹⁸ F]FDG

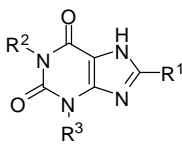
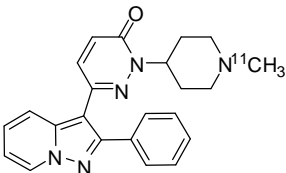
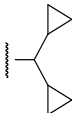
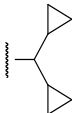
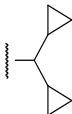
3.7 ÜBERSICHT ÜBER BEKANNTE PET-LIGANDEN ZUR UNTERSUCHUNG VON P1-REZEPTOREN

3.7.1 ANTAGONISTISCHE PET-LIGANDEN FÜR DEN A₁-ADENOSIN-REZEPTOR

Die Entwicklung der PET-Liganden zur Untersuchung des A₁-Rezeptors begann 1995 mit der Synthese Xanthin-basierter Moleküle. Als Leitstrukturen wurden die Verbindungen 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX, **27a**) und 8-Dicyclopropylmethyl-1,3-dipropylxanthin (KF15372) verwendet. Beide besitzen zwei Propylreste, die ¹¹C-markiert werden können (siehe Tabelle 3-3). Ishiwata et al. synthetisierten zunächst die radioaktiv markierten Derivate [¹¹C]KF15372 (**27c**), [¹¹C]-Methyl-8-dicyclopropylmethyl-3-propylxanthin [¹¹C]MPDX (**27d**) und [¹¹C]-Ethyl-8-dicyclopropylmethyl-3-propylxanthin [¹¹C]EPDX (**27e**). Obwohl [¹¹C]MPDX im Vergleich zu [¹¹C]KF15372 nur eine geringere Affinität hinsichtlich des A₁-Rezeptors zeigt, wird es von den drei Derivaten aufgrund seiner hohen radiochemischen Ausbeute und seiner Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können, am häufigsten verwendet. Später entwickelten Holschbach et al. den radioaktiven Antagonisten [¹⁸F]-8-Cyclopentyl-3-(3-fluorpropyl)-1-propylxanthin [¹⁸F]CPFPX (**27b**).¹⁶³ Der Einbau von ¹⁸F in DPCPX statt dem bisher gebräuchlichen ¹¹C erhöhte nicht nur die Halbwertszeit der Verbindung, sondern führte auch zu einer Steigerung der Affinität und Selektivität für den A₁-Rezeptor. Aufgrund seiner großen Affinität und Selektivität *in vitro* und der sehr hohen Aufnahme sowie spezifischen Bindung *in vivo* ist [¹⁸F]CPFPX inzwischen ein häufig angewendeter PET-Ligand für die Untersuchung des A₁-Rezeptors.

Tabelle 3-3: Antagonistische PET-Liganden für den A₁-Rezeptor.

							
		27			28		
Nr.	Name	R ¹	R ²	R ³	K _i (A ₁) ± SEM ^a	A _{2A} /A ₁	Lit.
27a	DPCPX		Propyl	Propyl	6.4 ± 0.35 (gp) ^b 0.5 ± 0.2 (r) ^c 3.0 ± 0.8 (h) ^d	92	59,164- 166
27b	[¹⁸ F]CPFPX		Propyl	[¹⁸ F]3-Fluor-propyl	0.18 ± 0.02 (b) ^e	> 700	167

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>27</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>28</p> </div> </div>							
Nr.	Name	R ¹	R ²	R ³	K _i (A ₁) ± SEM ^a	A _{2A} /A ₁	Lit.
27c	[¹¹ C]KF15372		[¹¹ C]Propyl	Propyl	3.0 ± 0.21 (gp) ^b 0.99 ± 0.04 (r) ^f	143	59,164
27d	[¹¹ C]MPDX		[¹¹ C]Methyl	Propyl	4.2 (r) ^f	> 24	168
27e	[¹¹ C]EPDX		[¹¹ C]Ethyl	Propyl	1.7 (r) ^f	> 59	168
28	[¹¹ C]FR194921	--	--	--	2.91 ± 0.67 (r) ^g 4.96 ± 1.65 (m) ^h 6.49 ± 0.47 (h) ⁱ	> 34	169,170

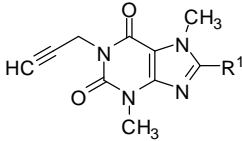
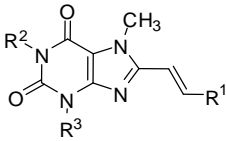
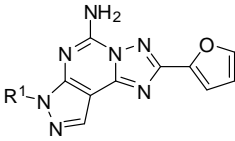
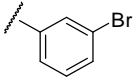
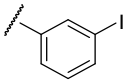
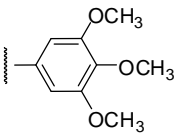
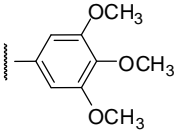
^aK_i ± SEM in nM; ^bKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]Cyclohexyladenosin gebunden am endogenen A₁-Rezeptor aus dem Vorderhirn von Meerschweinchen, n = 3 - 4; ^cKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]CCPA gebunden am endogen A₁-Rezeptor aus dem Rattenkortex, n = 3; ^dKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]CCPA gebunden am humanen A₁-Rezeptor exprimiert in CHO-Zellen, n = 3; ^eKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]CPX gebunden am endogenen A₁ Rezeptor aus dem cerebralen Cortex von Rindern, n = 3 - 5; ^fKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]Cyclohexyladenosin gebunden am endogenen A₁-Rezeptor aus dem Vorderhirn von Ratten; ^gKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]DPCPX gebunden am Ratten-A₁-Rezeptor exprimiert in CHO-Zellen, n = 3; ^hKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]DPCPX gebunden am Maus-A₁-Rezeptor exprimiert in CHO-Zellen, n = 3. ⁱKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]CPFPX gebunden am humanen A₁-Rezeptor; n = 3.

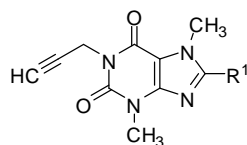
Seit 2005 findet erstmals eine Verbindung als PET-Ligand des A₁-Rezeptors Anwendung, die nicht Xanthin als Grundgerüst aufweist. [¹¹C]2-(1-Methyl-4-piperidiny)-6-(2-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-3(2*H*)-pyridazinon ([¹¹C]FR194921, **28**) ist ein Pyrazolopyrimidin und wurde erstmals 1998 von Akahane et al. synthetisiert.^{171,172} Im Gegensatz zu Xanthin-Derivaten, die im Allgemeinen hinsichtlich peripherer Metabolisierung recht instabil sind, weist [¹¹C]FR194921 im Plasma von Nagetieren auch nach 60 min nur eine Metabolisierung von 13 % auf.

3.7.2 ANTAGONISTISCHE PET-LIGANDEN FÜR DEN A_{2A}-REZEPTOR

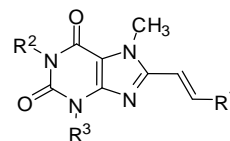
Ausgehend von 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthin (DMPX, **29**) als Leitstruktur wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Xanthin-Derivate synthetisiert (siehe Tabelle 3-4).¹⁷³ Diese sind DMPX sowohl in Bezug auf Affinität als auch Selektivität für den A_{2A}-Rezeptor überlegen.

Tabelle 3-4: A_{2A}-Antagonisten und PET-Liganden für den A_{2A}-Rezeptor¹⁷³

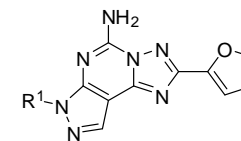
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>29</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>30</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>31</p> </div> </div>							
Nr.	Name	R ¹	R ²	R ³	K _i (A _{2A}) ± SEM ^a	A ₁ /A _{2A}	Lit.
29	DMPX	H	--	--	8600 ± 1600 (r) ^b 16000 ± 4000 (r) ^c 1993 ± 400 (h) ^d	1,4 ^e	61,174,175
30a	[¹¹ C]BS-DMPX		Methyl	Propinyl	7.7 ± 0.4 (r) ^b	300	176
30b	[¹¹ C]IS-DMPX		Methyl	Propinyl	8.9 ± 0.9 (r) ^b	> 1100	176
30c	[¹¹ C]KF19631		Allyl	Allyl	3.5 (r) ^b	250	177
30d	[¹¹ C]KF18446 = [¹¹ C]TMSX		Methyl	Methyl	5.9 (r) ^b	270	178



29



30



31

Nr.	Name	R ¹	R ²	R ³	K _i (A _{2A}) ± SEM ^a	A ₁ /A _{2A}	Lit.
30e	[¹¹ C]KF21213		Methyl	Methyl	3.0 (r) ^b	> 3300	179
30f	KF17837		Propyl	Propyl	1.0 (r) ^b	62	180
30g	[¹¹ C]KW-6002		Ethyl	Ethyl	2.2 ± 0.3 (r) ^b 151.8 ± 26 (h) ^d	68	180
31a	SCH-58261		--	--	2.3 ± 0.4 ^b 4.0 ± 0.6 (h) ^d	53	181
31b	[¹¹ C]SCH442416		--	--	0.5 ± 0.1 (r) ^f 0.048 ± 0.022 (h) ^g	3630 23145	182

^aK_i ± SEM in nM; ^bKompetition gegen Agonisten [³H]CGS21680 gebunden am endogenen A_{2A}-Rezeptor aus Rattenstriatum; ^cKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]NECA gebunden am endogenen A_{2A}-Rezeptor aus Rattenstriatum; ^dKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]MSX-2 gebunden am humanen A_{2A}-Rezeptor exprimiert in HEK293-Zellen, n = 3 - 4; ^eVergleich der Kompetition gegen Agonisten [³H]CHA gebunden am endogenen A₁-Rezeptor aus Rattencortex und der Kompetition gegen Agonisten [³H]CGS21680 gebunden am endogenen A_{2A}-Rezeptor aus Rattenstriatum; ^fKompetition gegen Agonisten [³H]SCH-58261 gebunden am endogenen A_{2A}-Rezeptor aus Rattenstriatum, n = 3; ^gKompetition gegen spezifischen Agonisten [³H]SCH-58261 gebunden am humanen A_{2A}-Rezeptor exprimiert in HEK-Zellen, n = 3.

Bromphenyl- und Iodphenyl-substituierte Verbindungen (**30a** bzw. **30b**) bieten zusätzlich die Möglichkeit einer Radiomarkierung mit ⁷⁵Br ($t_{1/2} = 1,7$ h) oder ⁷⁶Br ($t_{1/2} = 16,1$ h) bzw. ¹²⁴I ($t_{1/2} = 4,18$ Tage) oder ¹²³I ($t_{1/2} = 13,3$ h). Shimada et al. publizierten, dass 8-Styryl-Derivate des Xanthins selektive A_{2A}-Antagonisten darstellen.⁵⁸ Mehrere dieser Verbindungen wurden anschließend mit ¹¹C-Positronenemittern markiert und damit zu PET-Liganden weiterentwickelt (**30c - g**). Bei diesen Verbindungen handelt es sich vor allem um Verbindungen mit Methoxy-substituiertem Phenylrest. Da unter Lichteinfluss eine Photoisomerisierung der Styrylgruppe stattfinden kann, wird bei PET-Studien mit diesen Tracern bis zur Injektion und während der Plasma-Metabolit-Analyse unter gedämpftem Licht gearbeitet.

Neben den Xanthin-Derivaten wurden eine Reihe von Nicht-Xanthin-basierten Heterocyclen entwickelt. Abgeleitet vom hochaktiven und selektiven 7-(2-Phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidin (SCH58261, **31a**), welches kein geeignetes Synthon für die Synthese mit Positronenemittern besitzt, wurde 5-Amino-7-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidin (SCH442416, **31b**) synthetisiert, welches sich aufgrund der 4-Methoxygruppe für eine O-[¹¹C]Methylierung eignet.

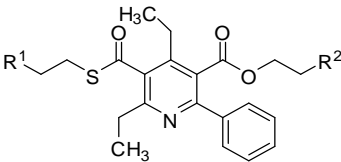
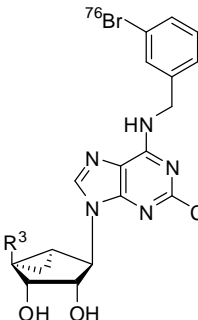
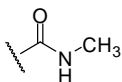
Im Gegensatz zu den Xanthin-basierten A₁-Rezeptor-Liganden zeigen die Verbindungen [¹¹C]TMSX und [¹¹C]KW-6002 nur einen langsamen Abbau im Plasma, wie in Studien an Mäusen und Ratten festgestellt werden konnte. Später zeigten Mishina et al., dass [¹¹C]TMSX im menschlichen Plasma nach 60 min sogar zu mehr als 90 % unmetabolisiert vorliegt.

Neben einer Anwendung der Radioliganden im ZNS, können die Xanthin-basierten Liganden auch für die Untersuchung von peripheren A_{2A}-Rezeptoren (z. B. im Muskel oder im Herz) verwendet werden.¹⁸³⁻¹⁸⁵

3.7.3 ANTAGONISTISCHE PET-LIGANDEN FÜR DEN A₃-REZEPTOR

Die Synthese eines PET-Tracers zur Untersuchung des A₃-Rezeptors wurde erstmalig 2008 publiziert. [¹⁸F]FE@SUPPY (**32a**) zeigt am humanen A₃-Rezeptor, der in HEK293-Zellen exprimiert wird, eine gute Affinität und Selektivität. Mittlerweile wurde auch eine zweite Verbindung ([¹⁸F]FE@SUPPY:2) veröffentlicht, die sich von ihrem Vorläufer in der Position des Fluoratoms unterscheidet. Allerdings sind von dieser Verbindung bisher weder Spezifität noch Selektivität bekannt. Im selben Jahr wurde erstmals die Synthese von N⁶-(3-Brombenzyl)-substituierten N-Methanocarpa-5'-uronamid-Analoga (**33**) veröffentlicht. Radioligand-Bindungsstudien an humanen und murinen A₃-Rezeptoren ergaben eine Affinität im subnanomolaren Bereich und eine mäßige bis hohe Selektivität im Vergleich zum A₁-Rezeptor.

Tabelle 3-5: A₃-Antagonisten und PET-Liganden für den A₃-Rezeptor

							
		32		33			
Nr.	Name	R ¹	R ²	R ³	K _i (A ₃) ± SEM ^a	A ₁ /A ₃	Lit.
32a	[¹⁸ F]FE@SUPPY	H	[¹⁸ F]	--	4.22 ± 0.66 (h) ^b	2700 ^c	186,187
32b	[¹⁸ F]FE@SUPPY:2	[¹⁸ F]	H	--	--	--	188
33a	--	--	--	H	0.73 ± 0.30 (h) ^d	2411	189
33b	--	--	--		0.90 ± 0.22 (m) ^e 0.38 ± 0.11 (h) ^d	9.8 711	190

^aK_i ± SEM in nM; ^bKompetition gegen spezifischen Agonisten [¹²⁵I]AB-MECA gebunden am humanen A₃ Rezeptor exprimiert in HEK-Zellen, (n = 3 - 4); ^crA₁ / hA₃; ^dKompetition gegen spezifischen Agonisten [¹²⁵I]AB-MECA gebunden am humanen A₃-Rezeptor exprimiert in CHO-Zellen; ^eKompetition gegen spezifischen Agonisten [¹²⁵I]AB-MECA gebunden am murinen A₃ Rezeptor exprimiert in HEK-Zellen.

3.8 SYNTHESE VON N⁶-CYCLOPENTYL-5'-DESOXY-5'-FLUORADENOSIN

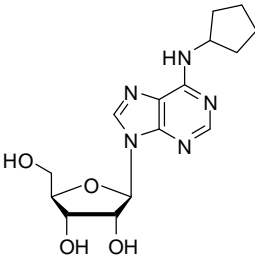
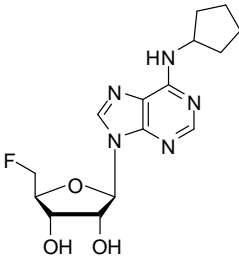
3.8.1 EINLEITUNG

Wie bereits in Kapitel 3.7 beschrieben, sind bisher nur antagonistische PET-Liganden zur Untersuchung des A₁-Rezeptors synthetisiert worden. Diese zeigen im Allgemeinen eine nur schlechte Wasserlöslichkeit, die die Applikation der Verbindungen erschwert. Abgesehen von [¹⁸F]CPFPX sind ferner alle bekannten Verbindungen mit dem Radioisotop ¹¹C markiert. Die kurze Halbwertszeit von nur 20 min schließen eine Verwendung in metabolischen Untersuchungen, die länger als ein paar Halbwertszeiten dauern, oder einen Transport der Verbindungen aus. Außerdem zeigen diese Verbindungen in einigen Fällen eine hohe unspezifische Bindung, vor allem in peripherem Gewebe.

Nucleosid-Derivate könnten als agonistische PET-Liganden diese Nachteile umgehen. Im Allgemeinen zeigen sie nicht nur eine verbesserte Wasserlöslichkeit, sondern auch eine geringere unspezifische Bindung. Ein besonderer Vorteil bei der Verwendung von Agonisten als PET-Liganden wäre die selektive Markierung funktioneller Rezeptoren. Antagonistische Liganden hingegen markieren alle Rezeptorkonfigurationen. Aus diesem Grund befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Synthese eines geeigneten agonistischen PET-Ligand-Vorläufers.

Als entsprechendes Vorläufermolekül sind nur Verbindungen geeignet, die eine sehr gute Affinität zum A₁-Rezeptor zeigen (siehe Kapitel 1.3.2). Außerdem muss die entsprechende Verbindung eine gute Selektivität gegenüber den anderen Adenosin-Rezeptor-Subtypen aufweisen. Einer der meistverwendeten A₁-Agonisten ist *N*⁶-Cyclopentyladenosin (CPA, **3**). Die Monosubstitution in *N*⁶-Position führt zu einer hohen Aktivität am A₁-Rezeptor und einer guten Selektivität gegenüber den anderen Adenosin-Rezeptoren (siehe Tabelle 3-6). Ferner bieten die Hydroxygruppen der Ribose eine gute Möglichkeit der radioaktiven Markierung mit ¹⁸F. Dabei ist zu beachten, dass Syntheseschritte nach dem Einfügen des Radioisotops die Ausbeute und die spezifische Radioaktivität verringern. Die radioaktive Markierung einer Verbindung wird also im Idealfall so spät wie möglich durchgeführt. Besonders leicht lässt sich diese Markierung durch Substitution der 5'-Hydroxygruppe der Ribose durchführen. Da es möglich ist, die beiden *cis*-ständigen, vicinalen Hydroxygruppen des Riboserestes gemeinsam zu schützen, ist eine selektive Fluorierung in 5'-Position realisierbar. In früheren Studien konnte bereits *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (**34**) als nanomolarer Agonist am Ratten- und humanen A₁-Rezeptor identifiziert werden (siehe Tabelle 3-6).¹⁹¹

Tabelle 3-6: Affinität der A₁-Rezeptor-Agonisten CPA (3**) und *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (**34**) an den vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen.**

 <p>3 CPA</p>	 <p>34 <i>N</i>⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin</p>				
Verbindung	A ₁ ^a	A _{2A} ^a	A _{2B} ^b	A ₃ ^a	Lit.
3	5.0 (r) 2.3 (h)	3370 (r) 794 (h)	18600 (h)	26 (r) 42 (h)	50,52,53
34	1.55 (r) 5.59 (h)	> 10000	n. d.	2270 (h)	191

^aK_i-Werte (in nM); ^bEC₅₀-Werte (in nM) aus Adenylatcyclase-Assays; r = Ratte, h = human

Mit einem K_i-Wert von 1.55 nM am Ratten-A₁-Rezeptor und 5.59 nM am humanen A₁-Rezeptor ist die Verbindung hochaffin. Außerdem weist sie eine ausgeprägte Selektivität gegenüber dem A_{2A}-Rezeptor (> 6400-fach) und dem A₃-Rezeptor (> 1400-fach) auf. Sie bietet damit gute Voraussetzungen für einen Einsatz als agonistischer Ligand in der Positronen-Emissions-Tomographie. Die dargestellten Arbeiten wurden in Kooperation mit der Abteilung „Nuklearchemie“ am Institut für Neurowissenschaften und Medizin des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

3.8.2 SYNTHESE

Prinzipiell gibt es zur Synthese *N*⁶-substituierter Adenosin-Derivate zwei Synthesewege. Einerseits ist eine Synthese durch N-Glycosylierung von Adenin-Derivaten möglich (siehe Abbildung 3.6). Weit verbreitete Methoden zur Herstellung von Nucleobasen sind die Koenigs-Knorr-Reaktion und die Vorbrüggen-Synthese.

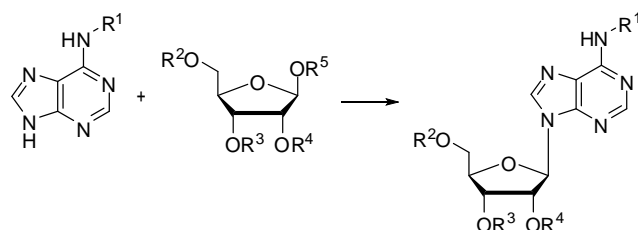


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der N-Glycosylierung von Adenin-Derivaten.

Bei der Koenigs-Knorr-Reaktion wird das Silbersalz des Adenin-Derivates mit der durch Halogenierung aktivierten Ribose zur Reaktion gebracht.¹⁹² Bei der Vorbrüggen-Synthese reagiert zunächst die acetylierte Ribose mit einer Lewis-Säure. Dadurch bildet sich ein Carbokation, das dann mit einem silylierten Adenin-Derivat zum Adenosin-Derivat umgesetzt wird.¹⁹³

Andererseits ist die Derivatisierung eines Nucleosids wie Inosin zum Adenosin-Derivat möglich. Der Vorteil dieser Methode sind die bereits festgelegte Stereochemie des Moleküls und die leichte Derivatisierung zum Adenosin-Derivat, weshalb diese Methode in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Als Ausgangsmaterial für die Synthese von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin wurde Inosin (**35**) gewählt. Die Derivatisierung des Inosins (**35**) beginnt mit der Schützung aller Ribose-Hydroxygruppen als Acetat.

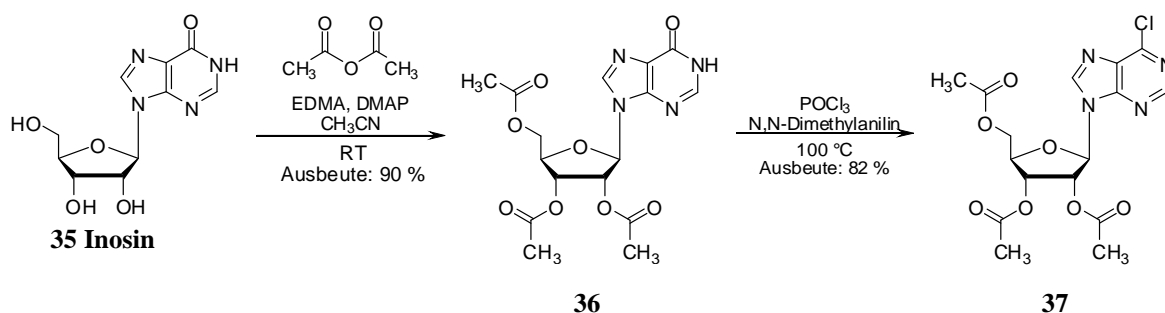


Abbildung 3.7: Darstellung von 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)purin (**37**).

Dazu wurde Inosin mit Acetanhydrid, 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator und Ethyldimethylamin (EDMA) als Base in Acetonitril bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare Lösung entstanden ist (siehe Abbildung 3.7). Durch die Zugabe von Methanol wurde die Reak-

tion abgebrochen. Die flüchtigen Reagenzien wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde aus Isopropanol umkristallisiert.¹⁹⁴ Anschließend erfolgte die Aktivierung der Lactam-Funktion als Chlorid (siehe Abbildung 3.7).¹⁹⁵ Das Produkt 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)purin (**37**) wurde in 82 %iger Ausbeute erhalten.

Für die anschließende Aminierung zum *N*⁶-Cyclopentyladenosin (**3**) wurde Verbindung **37** zunächst mit Cyclopentylamin über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt (siehe Abbildung 3.8). Allerdings zeigte sich, dass das Nebenprodukt *N*-Cyclopentylacetamid (**38**), das durch die Abspaltung der Schutzgruppen entstanden war, sich säulenchromatographisch nur schwer aus der Reaktionsmischung entfernen ließ. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Verbindung kein aromatisches System besitzt und sich somit nicht mit den bei 254 nm fluoreszierenden Dünnschichtchromatographie-Platten detektieren lässt. Auch die Verwendung verschiedener Sprühreagenzien konnte keine Anfärbung des Nebenproduktes auf den DC-Platten hervorrufen. Zur Abtrennung des Produktes (**3**) vom Nebenprodukt (**38**) wurde die Produkt-Mischung zunächst in wenigen Millilitern Ethanol gelöst und das Nebenprodukt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Nach dem Einengen der Mutterlauge wurde das Produkt durch Zugabe von Petrolether gefällt und säulenchromatographisch aufgereinigt. Dazu wurde ein Lösungsmittelgradient, beginnend bei 5 % Isopropanol in Dichlormethan nach 20 % Isopropanol in Dichlormethan, verwendet. Da beide Fällungen nicht quantitativ durchgeführt werden konnten, ergab sich eine geringe Ausbeute der Synthese von nur 45 %.

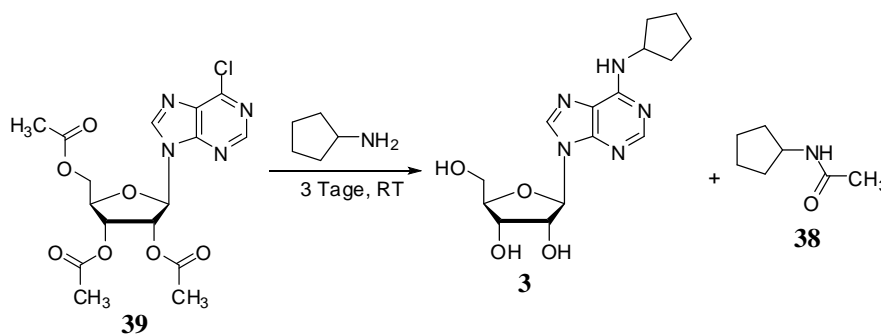


Abbildung 3.8: Bei der Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyladenosin (**3**) entstand als Nebenprodukt *N*-Cyclopentylacetamid (**38**), welches sich nur schwer aus der Reaktionsmischung entfernen ließ.

Um eine verbesserte Ausbeute für die Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyladenosin zu erreichen, wurde in späteren Experimenten die Benzoyl-Gruppe als Schutzgruppe verwendet. Durch deren aromatischem Rest ist eine Isolierung des Nebenproduktes *N*-Cyclopentylbenzamid möglich. Zur Einführung der Benzoyl-Schutzgruppe wurden zwei verschiedene Vorschriften getestet. Zunächst wurde zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus Inosin in Pyridin nacheinander Chloroform und Benzoylchlorid gegeben. Die Mischung wurde für 2 h bei 100 °C gerührt.¹⁹⁶ Das Produkt wurde durch Extraktion mit Diethylether in einer Ausbeute von 92 % erhalten

(siehe Abbildung 3.9). In späteren Versuchen wurde stattdessen Inosin analog zur Darstellung von **36** mit Benzoylchlorid, DMAP als Katalysator und EDMA als Base in Acetonitril bei Raumtemperatur umgesetzt.¹⁹⁴ Diese Reaktion erzielte eine Ausbeute von 97 % (siehe Abbildung 3.9).

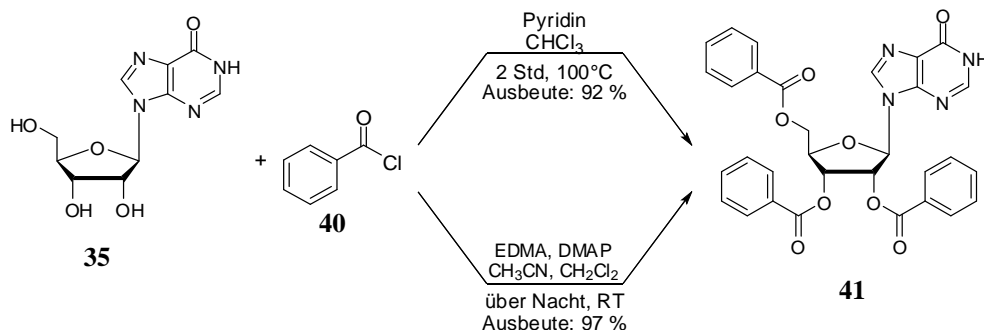


Abbildung 3.9: Gegenüberstellung der zwei Möglichkeiten zur Darstellung von 2',3',5'-Tri-O-benzoylinosin (**41**).

Die Chlorierung des geschützten Inosins (**41**) erfolgte analog der Synthese von Verbindung **37** mit Phosphorylchlorid (siehe Abbildung 3.10).

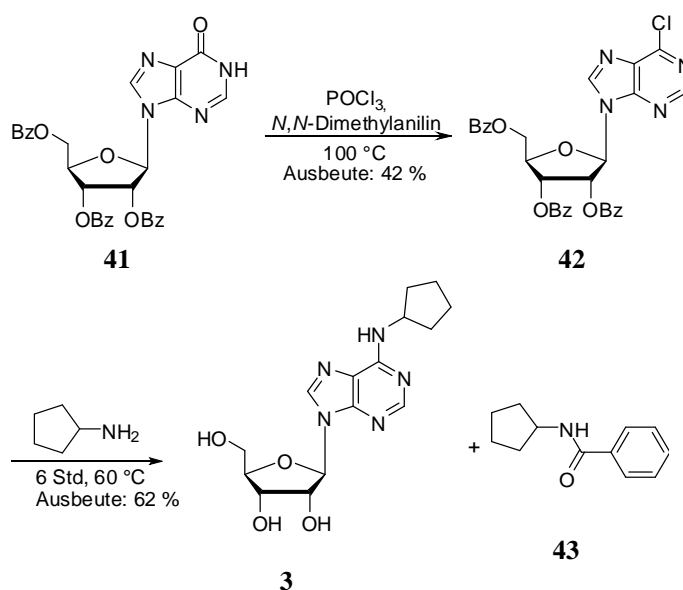


Abbildung 3.10: Darstellung von N⁶-Cyclopentyladenosin (**3**) ausgehend von 2',3',5'-Tri-O-benzoylinosin (**41**).

Die Synthese des N⁶-Cyclopentyladenosins (**3**) konnte schließlich bei 60 °C mit einer Ausbeute von 62 % durchgeführt werden (siehe Abbildung 3.10). Das Nebenprodukt N-Cyclopentylbenzamid (**43**) wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol; 90 : 10) entfernt.

Um nun eine Modifikation der 5'-Position durchführen zu können, mussten zunächst die *cis*-ständigen 2'- und 3'-Hydroxygruppen adäquat geschützt werden. In früheren Experimenten

wurde häufig die Acetonid-Schutzgruppe (Isopropyliden-Ketal) zur Schützung von vicinalen Diolen verwendet (**44**, siehe Abbildung 3.11).¹⁹⁷

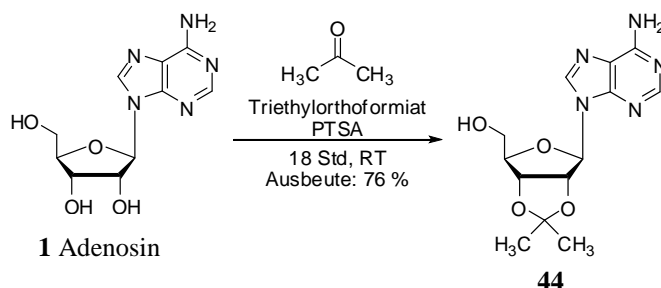


Abbildung 3.11: Darstellung von 2',3'-*O*-*p*-Isopropylidenadenosin (**44**).¹⁹⁸

Die Synthese bietet den Vorteil, dass sie sehr kostengünstig durchführbar ist und das Produkt leicht und in hohen Ausbeuten liefert. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfordert jedoch meist stark saure Bedingungen und unter Umständen hohe Temperaturen und kann somit auch zur Spaltung säurelabiler Bindungen, wie der nucleosidischen Bindung führen. Beachtet man weiterhin, dass ein PET-Vorläufermolekül hergestellt werden soll, muss in Betracht gezogen werden, dass die Schutzgruppe erst nach der radioaktiven Markierung wieder abgespalten wird. Da die Halbwertszeit von ¹⁸F mit 110 min nur ein begrenztes Zeitfenster für die Reaktion zulässt, sollte eine Schutzgruppe verwendet werden, die zwar ausreichende Stabilität für die nächsten Reaktionen bietet, sich aber leicht und mit möglichst wenig Aufwand auch von einem radioaktiven Molekül abspalten lässt. Die Wahl fiel deshalb auf die Anisyliden-Schutzgruppe (*p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe), die bereits seit 1962 vermehrt Anwendung findet und auch in unserer Arbeitsgruppe schon erfolgreich eingesetzt wurde.¹⁹⁹ Dr. Andreas Brunschweiger hatte bereits in seiner Dissertationsschrift die Synthese zur Schützung von 5 g Adenosin verwendet.²⁰⁰ Zunächst wurde deshalb in einem ersten Versuch getestet, ob diese Vorschrift auch in einem sehr viel kleineren Maßstab von nur 100 mg Edukt durchführbar ist. Dazu wurden 100 mg Adenosin (**1**) mit 200 mg Zinkchlorid in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung der Reaktion konnten in der Reaktionsmischung jedoch ausschließlich das Edukt sowie *p*-Methoxybenzoesäure detektiert werden (siehe Abbildung 3.12). Obwohl unter Wasserausschluss und unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet wurde, ist es vermutlich durch in der Reaktion vorhandene Wasserreste zur Rückreaktion und damit zur Bildung der Säure gekommen. Die verwendete Vorschrift konnte also nicht ohne Weiteres auf einen kleineren Maßstab übertragen werden. Aus diesem Grund wurde in der Literatur nach einer anderen Methode zur Einführung der *p*-Anisylidenschutzgruppe gesucht. Zunächst wurde eine Vorschrift von Riley et al.²⁰¹ mit Adenosin (**1**) als Edukt getestet. Bei dieser Methode wird als Reagenz statt Anisaldehyd das Dimethylacetal des Anisaldehyds verwendet (siehe Abbildung 3.12). Dadurch entsteht bei der Schützung kein Wasser, welches die

Rückreaktion fördert, sondern Methanol, welches mittels einer Destillationsapparatur entfernt werden kann. Diese Reaktion konnte mit Adenosin im Milligramm-Maßstab durchgeführt werden und das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufarbeitung sauber, jedoch nur in mittlerer Ausbeute (60 %) erhalten.

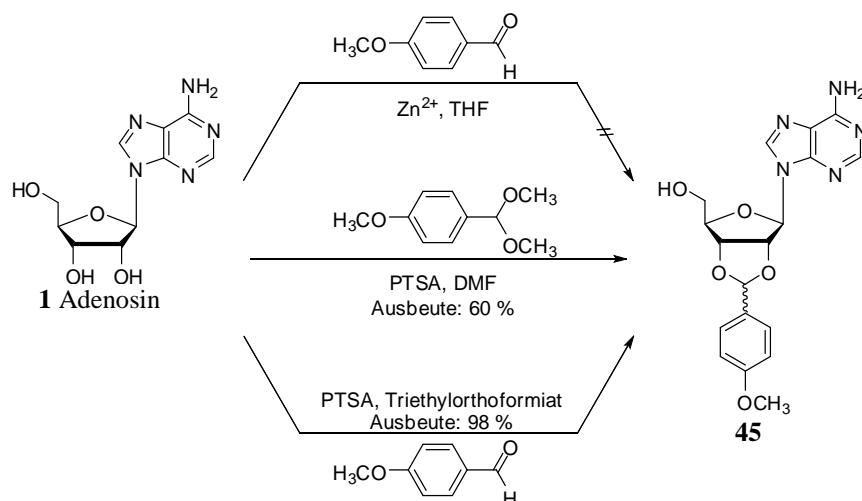


Abbildung 3.12: Gegenüberstellung der drei Vorschriften zur Darstellung von 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzylidenadenosin (**45**).^{201,202}

Aus diesem Grund wurde eine zweite Vorschrift von Marwood et al.²⁰² getestet, bei der Adenosin (**1**) mit Anisaldehyd in Gegenwart von Triethylorthoformiat und *p*-Toluensulfonsäure umgesetzt wurde (siehe Abbildung 3.12).

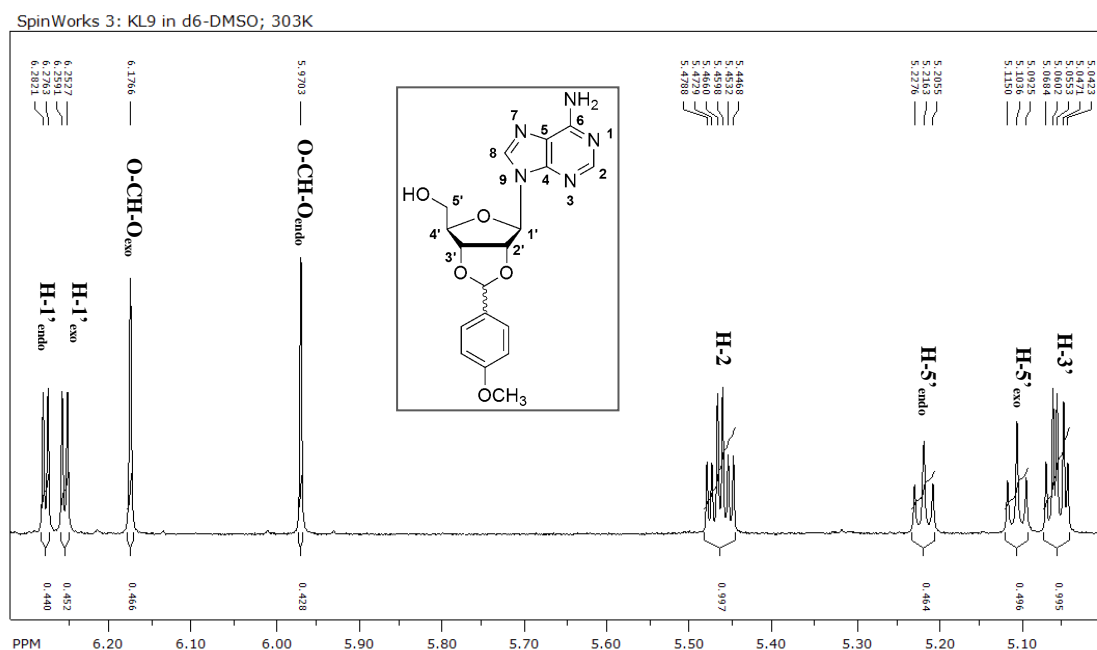


Abbildung 3.13: Ausschnitt aus dem ¹H-Spektrum der Verbindung **45**.

Die Zugabe des Orthoesters Triethylorthoformiat bewirkt aufgrund seiner wasserziehenden Eigenschaft eine Gleichgewichtsverschiebung zugunsten des Produktes. Der Vorteil dieser Reaktion gegenüber der Verwendung des Diacetals liegt vor allem in der höheren Ausbeute, der leichten Durchführbarkeit und dem geringeren Preis des Anisaldehydes gegenüber dem Diacetal. Auffällig ist, dass bei der Vorschrift nach Riley et al. ein quasi diastereomerenreines Produkt erhalten wurde. Die Vorschrift nach Marwood et al. ergab hingegen ein 1 : 1-Gemisch aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren. Beide Isomere konnten sowohl mittels Dünnschichtchromatographie als auch mit ¹H- und ¹³C-NMR detektiert werden (siehe Abbildung 3.13). Durch Analyse der Kern-Overhauser-Effekte (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE) konnten Bakthavachalam et al. die relativen Abstände der einzelnen Gruppen und damit die relative Konfiguration der beiden Isomere bestimmen.²⁰³ Die Zuordnung der NMR-Signale für Verbindung **45** erfolgte durch Vergleich mit den von Bakthavachalam publizierten Daten.

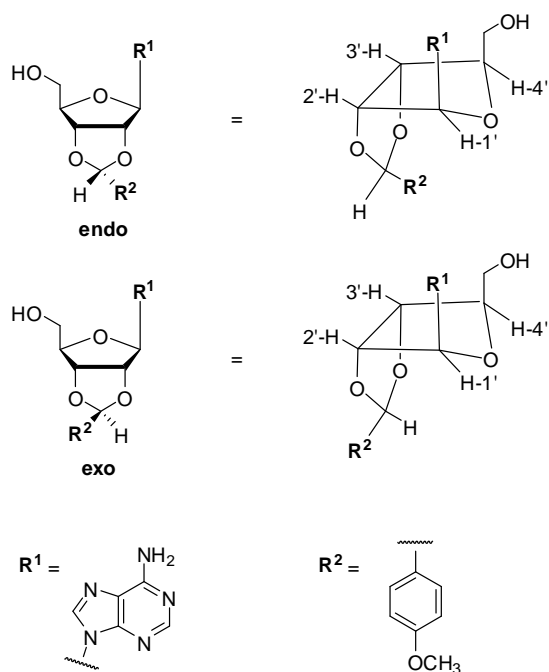


Abbildung 3.14: Räumliche Anordnung der beiden Diastereomere von 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzylidenadenosin (45**).²⁰³**

Beide Methoden wurden schließlich mit *N*⁶-Cyclopentyladenosin (**3**) als Edukt durchgeführt und ergaben jeweils die Bildung von *N*⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin. Jedoch konnte nur mit der Methode nach Marwood et al. das Produkt in ausreichender Reinheit und guter Ausbeute erhalten werden (siehe Abbildung 3.15).²⁰² Auch mit *N*⁶-Cyclopentyladenosin (**3**) als Edukt erhielt man ein Diastereomeren-Gemisch. Das Verhältnis betrug 65 : 35 zugunsten des *exo*-Diastereomers (siehe Abbildung 3.16).

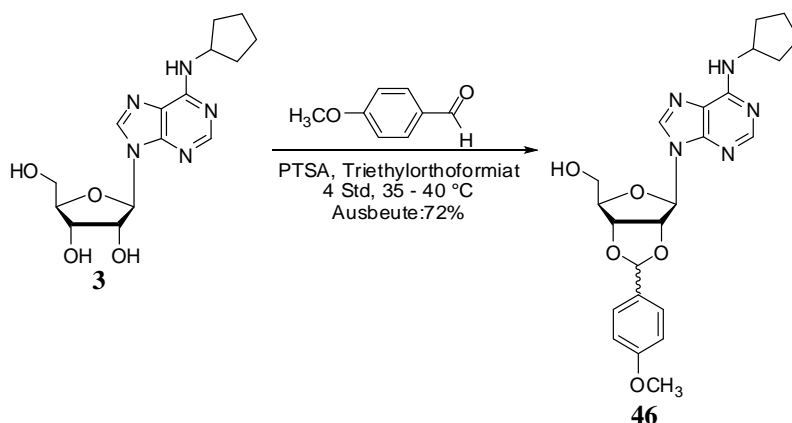


Abbildung 3.15: Darstellung von N⁶-Cyclopentyl-2',3'-O-p-methoxybenzylidenadenosin (**46**).²⁰²

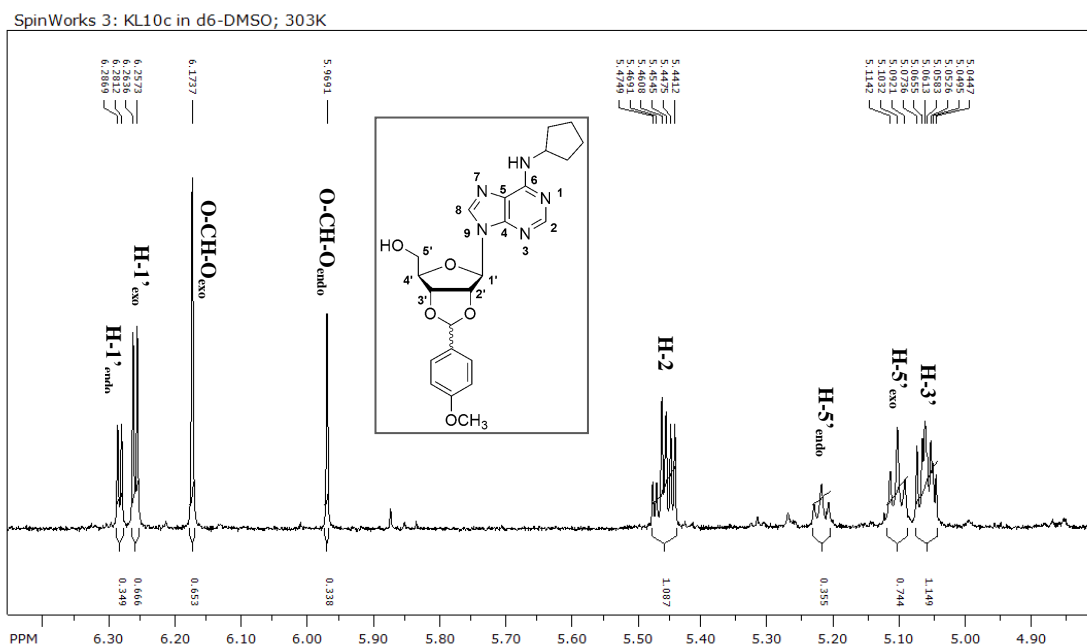


Abbildung 3.16: Ausschnitt aus dem ¹H-Spektrum der Verbindung **46**.

Im Folgenden sollte die 5'-Hydroxygruppe durch Fluor substituiert werden. Da es sich bei der Hydroxygruppe jedoch um ein schlechtes Nucleofug handelt, musste diese zunächst in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt werden. Die erste Wahl war dabei die Toluensulfonylgruppe (folgend Tosylgruppe genannt), die aufgrund ihrer elektronenziehenden Eigenschaft eine gute Abgangsgruppe darstellt. Die Tosylgruppe sollte nach Vorschrift von Le et al. mit Pyridin als Base eingeführt werden (siehe Abbildung 3.17).²⁰⁴ Zur Bestimmung der Reaktionsbedingungen wurde zunächst das N⁶-unsubstituierte 2',3'-O-p-Anisylidenadenosin (**45**) unter Schutzgas-Atmosphäre und Eiskühlung mit Pyridin versetzt und 10 min gerührt. Nach Zugabe von p-Toluensulfonsäurechlorid wurde die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es konnte jedoch keine Umsetzung des Eduktes erzielt werden. Deshalb wurden alternativ sowohl 1,4-Diaza-

bicyclo[2,2,2]octan (DABCO)²⁰⁵ als auch 2,6-Lutidin als Basen getestet (siehe Abbildung 3.17). Jedoch führten auch diese Modifikationen der Reaktion zu keinem positiven Ergebnis.

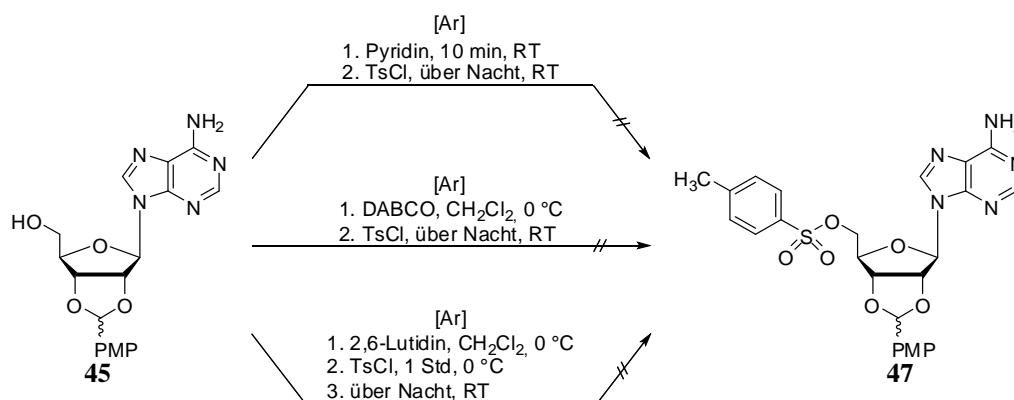


Abbildung 3.17: Gegenüberstellung der drei getesteten Vorschriften zur Darstellung von 5'-Desoxy-5'-tosyl-2',3'-O-p-methoxybenzylidenadenosin (47); PMP = *p*-Methoxyphenyl.^{204,205}

Schließlich wurde stattdessen eine andere Abgangsgruppe verwendet. Die Wahl fiel dabei auf die kleinere Methylsulfonylgruppe (im Folgenden Mesylgruppe genannt), die der Tosylgruppe hinsichtlich der Reaktivität sehr ähnlich ist.

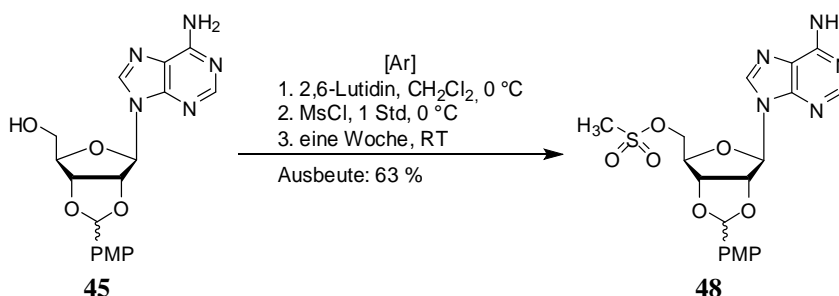


Abbildung 3.18: Darstellung von 5'-Desoxy-5'-mesyl-2',3'-O-p-methoxybenzylidenadenosin (48); PMP = *p*-Methoxyphenyl.

Das 2',3'-geschützte Adenosin (45) wurde unter Argonatmosphäre bei 0 °C mit 2,6-Lutidin deprotoniert und anschließend mit Mesylchlorid umgesetzt (siehe Abbildung 3.18). Die nur geringe Differenz der *R_f*-Werte zwischen Edukt und Produkt und das Vorhandensein von *exo*- und *endo*-Diastereomeren erschwerte eine Detektion des Produktes mittels Dünnschichtchromatographie sowie die säulenchromatographische Aufarbeitung der Verbindung. Wie alle Sulfonat-Gruppen ist auch die Mesylatgruppe sehr reaktiv und besitzt eine begrenzte Lebensdauer. Deshalb ist es von besonderer Bedeutung, dass die Verbindung nicht erhitzt wird. Auch die Verwendung eines Rotationsverdampfers zur Entfernung des Lösungsmittels ist nur unter Raumtemperatur möglich. Die nachfolgende säulenchromatographische Aufarbeitung der Verbindung erfolgte deshalb möglichst schnell und das erhaltene Produkt wurde sofort für die Fluorierung verwendet. Dazu

wurden 5'-Desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**48**) in trockenem Dioxan in einem Mikrowellengefäß gelöst und mit Tetrabutylammoniumdifluorid-Lösung (50 % in Acetonitril) (TBABF) und Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat (TBAF) sowie drei Tropfen trockenem Pyridin in der Mikrowelle umgesetzt (siehe Abbildung 3.19).²⁰⁴ Die Reaktion lieferte ein 1 : 1,6-Gemisch aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren in 44 %iger Ausbeute.

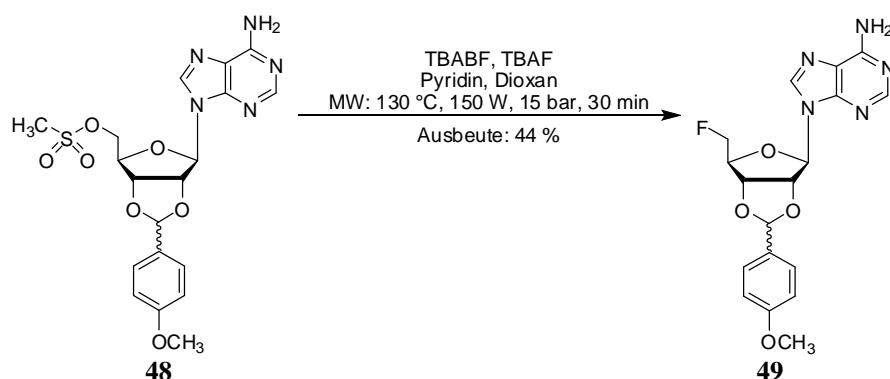


Abbildung 3.19: Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**49**); PMP = *p*-Methoxyphenyl.²⁰⁴

Die etablierte Vorschrift zur Einführung der Mesylat-Abgangsgruppe konnte anschließend auch auf *N*⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**46**) angewendet werden (siehe Abbildung 3.20).

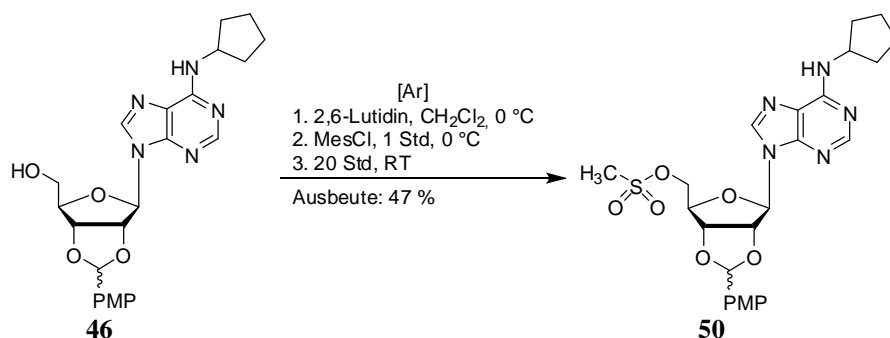


Abbildung 3.20: Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**); PMP = *p*-Methoxyphenyl.

Im Gegensatz zur Synthese von **48** war diese Reaktion bereits nach 20 h beendet. Da sich schon nach kurzer Zeit eine beginnende Zersetzung bemerkbar machte, wurde die Verbindung sofort weiter verarbeitet. Ein Teil der Verbindung wurde zur radioaktiven Markierung ans Forschungszentrum Jülich geschickt. Dort wurde die Verbindung zunächst bei Raumtemperatur mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie untersucht (siehe Abbildung 3.21). Das erhaltene Spektrum zeigte ein etwa 10 : 1-Verhältnis der intakten Mesylat-Verbindung (**51**) zum Eliminierungsprodukt (**52**) (siehe Abbildung 3.21 und Abbildung 3.23).

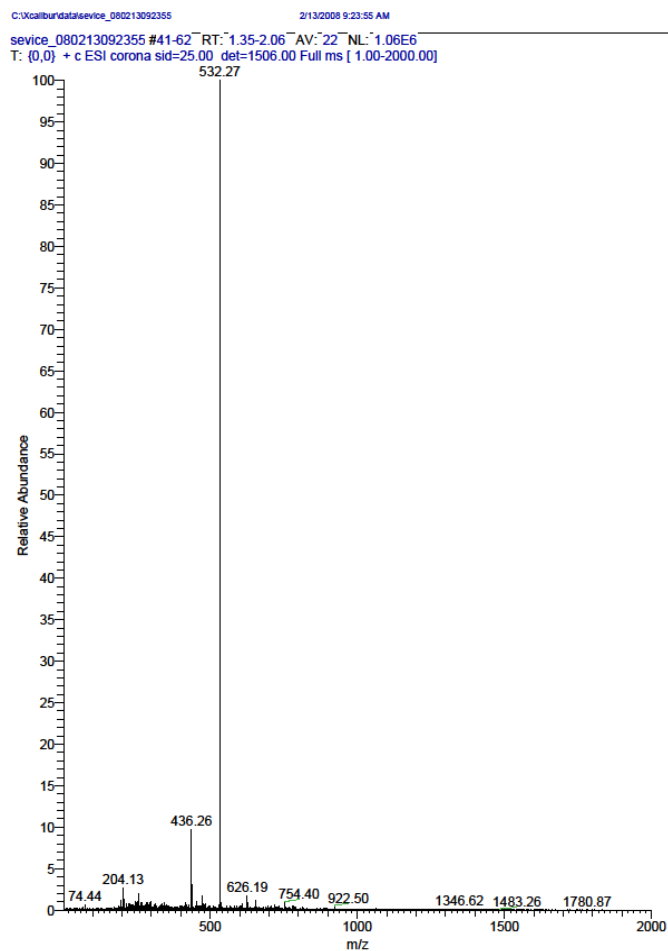


Abbildung 3.21: LCMS-Analyse des Mesylat-Standards (50) bei Raumtemperatur.

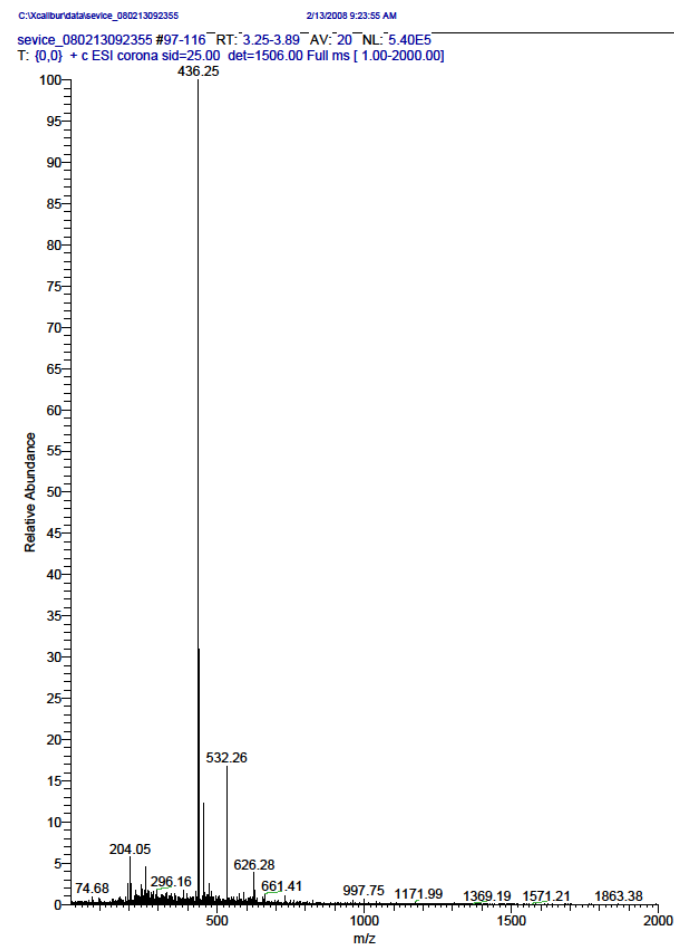


Abbildung 3.22: LCMS-Analyse des Mesylats (50) nach Umsetzung unter Standardfluorierungsbedingungen (Acetonitril oder DMSO, Kaliumcarbonat, Kryptofix® 222, 70 - 90 °C, 10 min).

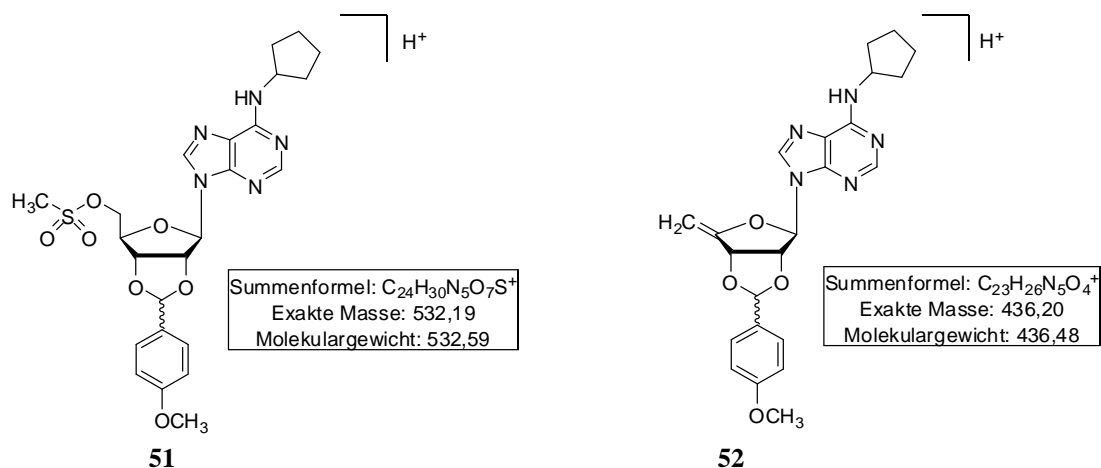


Abbildung 3.23: Strukturformel und chemische Daten der intakten Mesylat-Verbindung (51) und des Eliminierungsproduktes (52).

Die Anwesenheit des Eliminierungsproduktes verdeutlicht die Instabilität der Verbindung. Selbst der Transport auf Trockeneis führte schon in geringem Maß zur Zersetzung des Moleküls. Eine Lagerung der Verbindung ist auch unter Kühlung nur schwer möglich und eine sofortige Umsetzung des Moleküls notwendig.

Anschließend wurde die Stabilität der Mesylat-Verbindung unter den Bedingungen der radioaktiven Fluorierung überprüft (Abteilung „Nuklearchemie“ am Institut für Neurowissenschaften und Medizin des Forschungszentrums Jülich). Dazu wurde die Verbindung unter Standardfluorierungsbedingungen mit Kryptofix® 222 und Kaliumcarbonat in DMSO bzw. Acetonitril 10 min bei 70 - 90 °C erhitzt.

Sowohl bei nucleophilen Substitutionen als auch bei β -Eliminierungen stehen prinzipiell immer beide mechanistischen Verläufe in Konkurrenz zueinander. Die S_N2/E2-Konkurrenz wird durch die Geschwindigkeit der beiden konkurrierenden Reaktionen entschieden. In Abhängigkeit von der Art der zugesetzten Base und der Struktur des Substrates ist üblicherweise eine Steuerung der Reaktion zugunsten des einen oder anderen Mechanismus möglich. In einer S_N2-Reaktion greift ein Nucleophil das heteroatomsubstituierte C α -Atom an und muss dazu tief ins "Innere" des Substratmoleküls vordringen. Die Base in einer E2-Eliminierung abstrahiert dagegen ein an der Peripherie des Substratmoleküls liegendes Proton. Bei einer S_N2-Reaktion spielen sterische Abstoßungen deswegen eine viel größere Rolle als bei der Abspaltung des β -ständigen Protons durch die Base in einer E2-Eliminierung. Große, sterisch anspruchsvolle Substituenten sowohl an der Base als auch am Substrat begünstigen gewöhnlich die Eliminierung, wohingegen weiche Basen, die gleichzeitig gute Nucleophile sind, an primären Substraten die Reaktionsgeschwindigkeit der S_N2-Reaktion erhöhen.

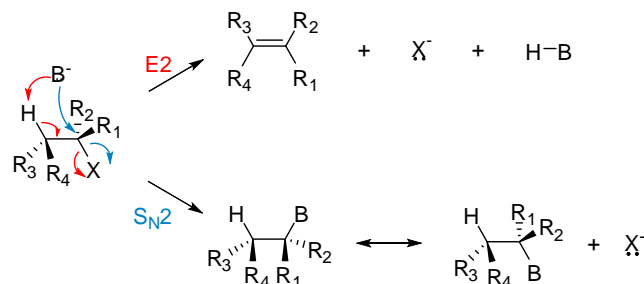


Abbildung 3.24: Schematische Darstellung der S_N2/E2-Konkurrenz.

Obwohl die geplante Fluorierung mit einem kleinen und starken Nucleophil an einem primären Cα-Atom stattfinden sollte, zeigte eine LCMS-Analyse der Reaktionsmischung, dass das Mesylat unter Standardfluorierungsbedingungen bereits nach 1,5 min bei 90 °C zu 90 % eliminiert wurde (siehe Abbildung 3.22). *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) ist aufgrund seiner Instabilität folglich kein geeignetes Vorläufermolekül für die Positronen-Emissions-Tomographie.

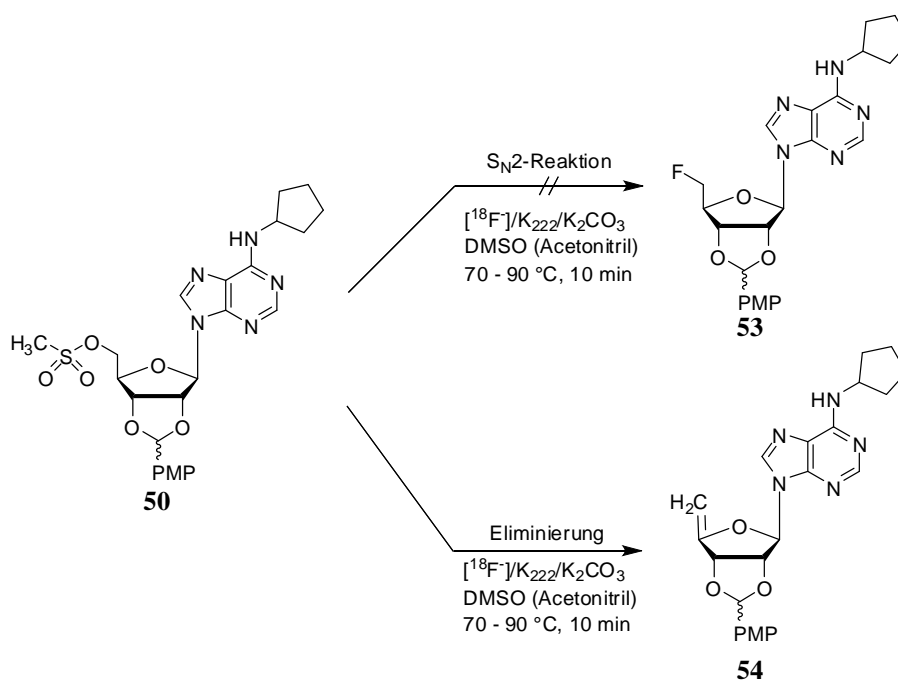


Abbildung 3.25: Die Fluorierung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) unter Standardfluorierungsbedingungen führt selektiv zur Eliminierungsreaktion; PMP = *p*-Methoxyphenyl.

Trotzdem wurde anschließend getestet, ob eine Fluorierung des Moleküls prinzipiell möglich ist, oder ob eine Fluorierung unter nicht-radioaktiven Bedingungen erzwungen werden kann.

Dazu wurde die Mesylat-Verbindung in unserem Labor nach der oben beschriebene Vorschrift von Le et al. fluoriert.²⁰⁴ Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 63 % erhalten werden (siehe Abbildung 3.26).

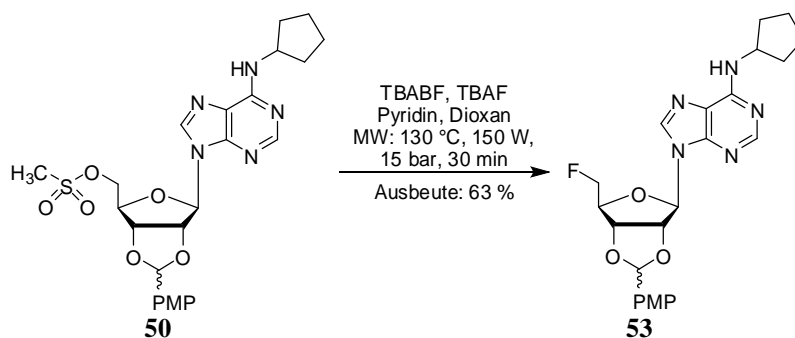


Abbildung 3.26: Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**53**); PMP = *p*-Methoxyphenyl.²⁰⁴

Eine S_N2-Reaktion kann also unter bestimmten Bedingungen erzwungen werden. Im Unterschied zur radioaktiven Fluorierung in Jülich ist es unter nicht-radioaktiven Bedingungen möglich, die Menge des Fluorierungsmittels beliebig anzupassen. So konnten für diese Reaktion pro mol Mesylat je zwei Äquivalente Tetrabutylammoniumdifluorid und zwei Äquivalente Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat eingesetzt werden. Radioaktive Fluorierungen sind hingegen weniger flexibel durchführbar. Einerseits sind nicht beliebige Mengen an Fluorierungsmittel verwendbar und andererseits ist nur ein begrenztes Spektrum an Fluorierungsmitteln verfügbar. In diesem Fall ist eine nicht-radioaktive Fluorierung möglich, die radioaktive Fluorierung führt jedoch aufgrund der technischen Einschränkungen dieser Reaktion zu keinem Ergebnis.

Als letzter Schritt der geplanten Synthese musste schließlich die 2',3'-*O*-*p*-Anisyliden-Schutzgruppe abgespalten werden. Diese Reaktion ist von besonderer Bedeutung, da diese Reaktion auch mit einem radioaktiv markierten Molekül durchführbar sein sollte. Üblicherweise werden die Acetalschutzgruppen unter sauren Bedingungen gespalten. Dazu wurden bereits einige Vorschriften publiziert, die die Verwendung von Ameisensäure, Essigsäure oder Trifluoressigsäure empfehlen.²⁰⁶⁻²¹¹ Dr. Andreas Brunschweiger aus unserer Arbeitsgruppe konnte in seiner Dissertation bereits erfolgreich die Abspaltung der *p*-Anisylidenschutzgruppe unter Verwendung von 3–5 % Trifluoressigsäure demonstrieren.²⁰⁰ Produktzersetzungen (z. B. die Spaltung der nucleosidischen Bindung), wie sie z. B. unter Verwendung von 10 % Trifluoressigsäure (nach Methode von Hanessian et al.)²⁰⁷ auftraten, konnten mit dieser Methode vermieden werden.²⁰⁰ Zur Abspaltung der *p*-Anisyliden-Schutzgruppe wurde *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**53**) mit einem Tropfen Wasser und 3 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan versetzt (siehe Abbildung 3.27). Die Reaktion wurde halbstündlich mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach 2 h war die Reaktion beendet. *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (**55**) wurde in 93 %iger Ausbeute erhalten. Unter Umständen könnte mit einer geringfügig größeren Menge an Trifluoressigsäure die Reaktionszeit verkürzt werden.

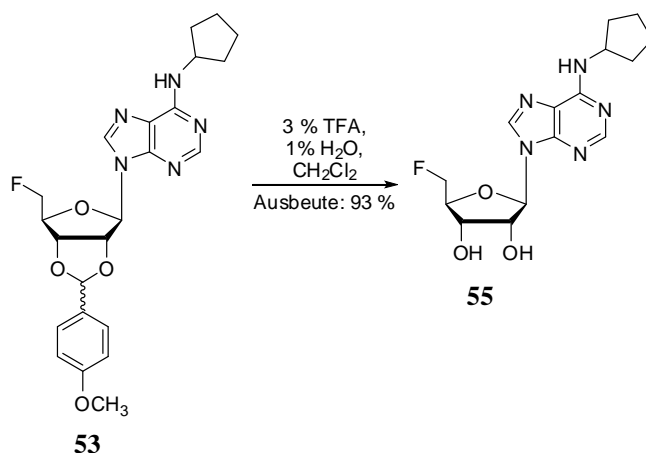


Abbildung 3.27: Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (**55**).

Nachdem die Synthese von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (**55**) vollständig abgeschlossen war und sich *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) als ungeeignete Vorstufe für die radioaktive Markierung herausgestellt hatte, wurde in einem weiteren Schritt schließlich noch eine andere Abgangsgruppe getestet. Bereits in früheren Versuchen mit Adenosin wurde bereits die Toluensulfonylgruppe als Abgangsgruppe in Betracht gezogen. Eine Synthese der Verbindung ließ sich jedoch nicht realisieren (siehe Abbildung 3.17). Aus diesem Grund wurde ursprünglich die Methansulfonylgruppe als Alternative ausgewählt. In den oben beschriebenen Experimenten konnte jedoch festgestellt werden, dass die Reaktion zur Einführung der Mesylgruppe in *N*⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**46**) in einer sehr viel kürzeren Reaktionszeit realisiert werden konnte als die Einführung in das *N*⁶-unsubstituierte 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzylidenadenosin (**45**). Deshalb bestand die Möglichkeit, dass die Einführung der Tosyl-Gruppe als Abgangsgruppe in *N*⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**46**) nun ebenfalls möglich sein könnte. Die Toluensulfonylgruppe ist im Vergleich zur Methansulfonylgruppe eine schlechtere Abgangsgruppe.

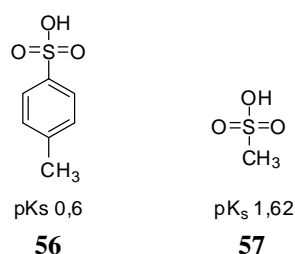


Abbildung 3.28: pK_s-Werte von *p*-Toluensulfonsäure (**56**) und Methansulfonsäure (**57**).^{212,213}

Die Abgangsgruppentendenz korreliert mit dem pK_s-Wert der korrespondierenden Säuren. Je stärker eine Säure, desto besser kann die negative Ladung, die nach der Abspaltung entsteht,

stabilisiert werden (siehe Abbildung 3.28). Die Verwendung von *p*-Toluensulfonylchlorid sollte also in einem Produkt resultieren, dessen Abgangsgruppe stabiler mit dem Molekül verbunden ist.

Die Synthese von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**) wurde analog zur Einführung der Mesylgruppe mit 2,6-Lutidin als Base durchgeführt. Es konnte jedoch keine vollständige Umsetzung des Eduktes erzielt werden. Auch nach Zugabe weiterer Äquivalente Base und Tosylchlorid konnte nach drei Tagen keine Veränderung der Reaktionsmischung mehr festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die Reaktion schließlich abgebrochen. Bei der Aufarbeitung wurde erneut versucht, möglichst schnell und ohne Wärmezufuhr zuarbeiten. *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**) konnte schließlich in 20 %iger Ausbeute gewonnen werden.

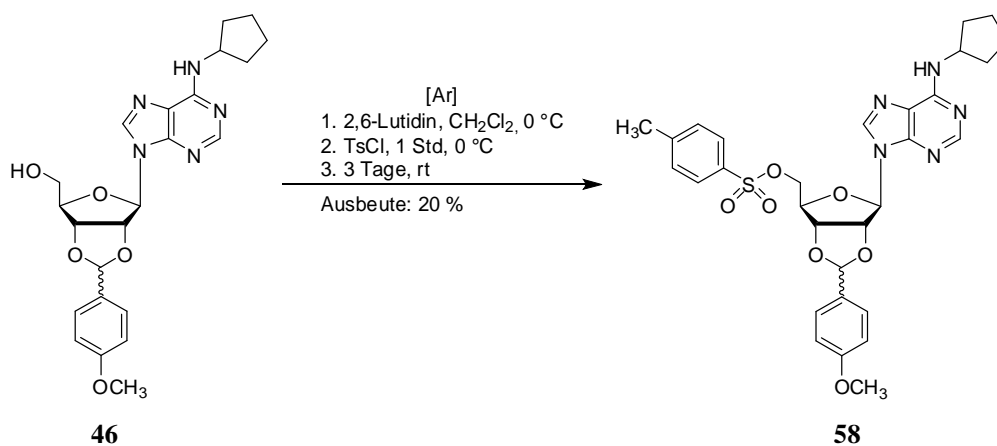


Abbildung 3.29: Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**).

Anschließend wurde die Stabilität der Tosylat-Verbindung (**58**) unter den Bedingungen der radioaktiven Fluorierung erneut überprüft (Abteilung „Nuklearchemie“ am Institut für Neurowissenschaften und Medizin des Forschungszentrums Jülich). Dazu wurde die Verbindung unter Standardfluorierungsbedingungen mit Kryptofix® 222 und Kaliumcarbonat in DMSO bzw. Acetonitril 10 min bei 70 - 90 °C erhitzt. Wie die Mesylat-Verbindung (**50**) wies auch das Tosylat (**58**) keine ausreichende Stabilität für die Fluorierung auf. Statt der Substitution war erneut die Eliminierung bevorzugt. Damit ist auch *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**) als PET-Vorläufermolekül ungeeignet.

Eine Zusammenfassung der bisherigen Syntheseroute ist in Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31 dargestellt.

Da weder *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) noch *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**) sich als geeignete

PET-Ligand-Vorläufermoleküle erwiesen, wurde anknüpfend ein vollständig neuer Ansatz ausgearbeitet. Dieser wird im folgenden Kapitel besprochen.

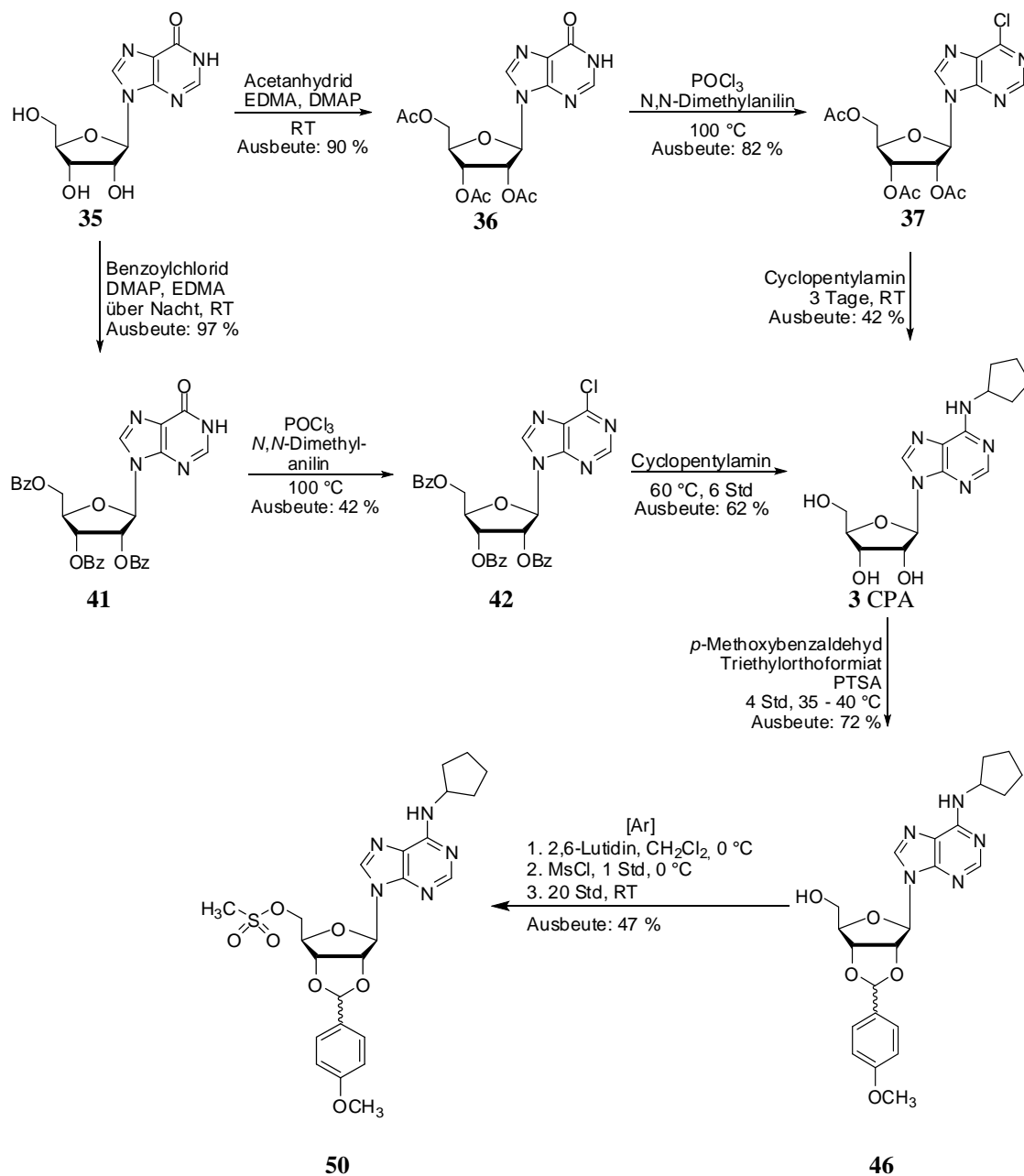


Abbildung 3.30: Zusammenfassung der Synthese von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5-fluoradenosin (55) – Teil 1.

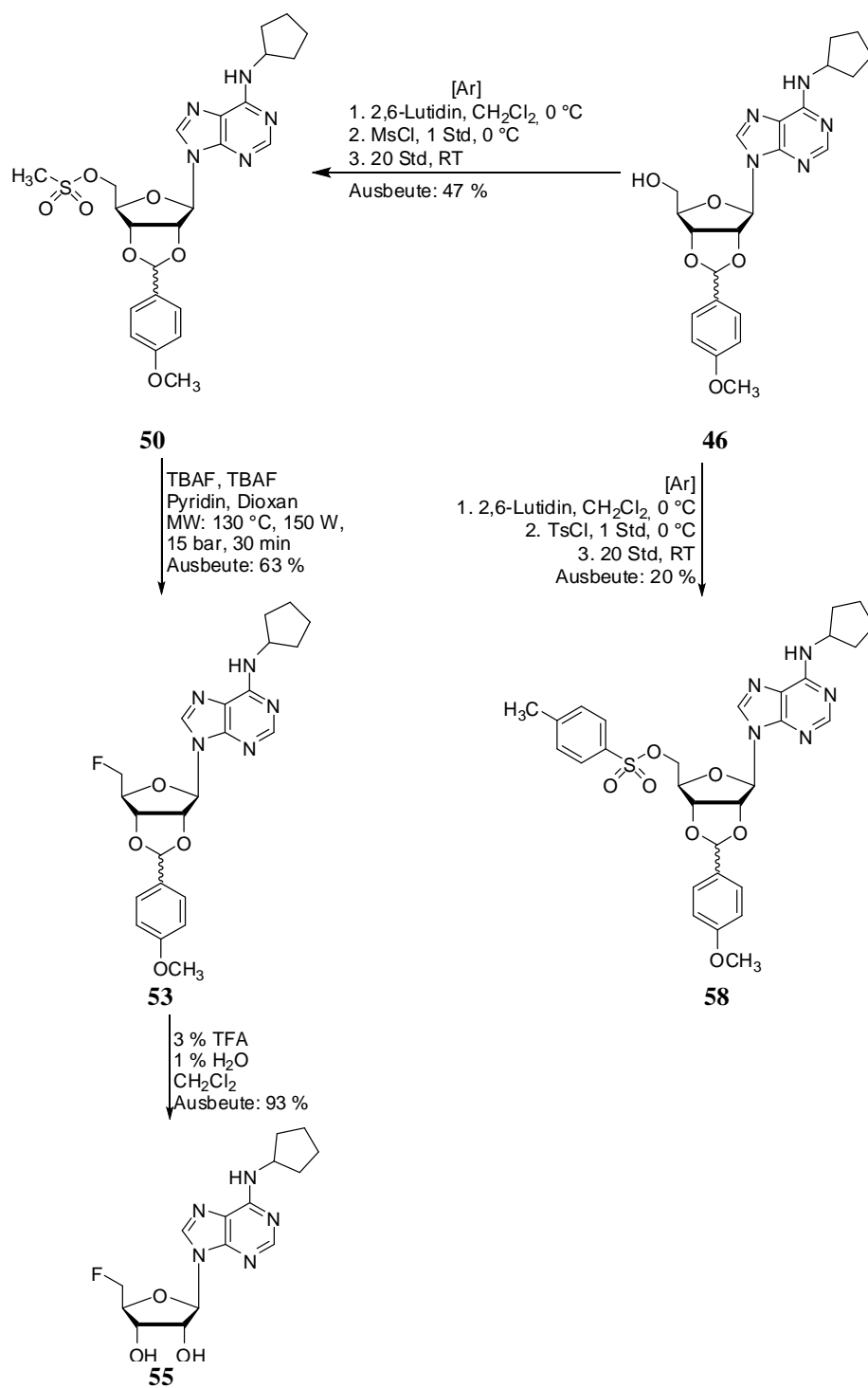


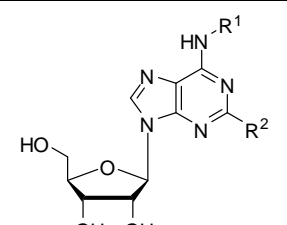
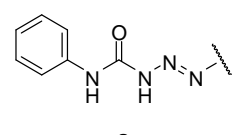
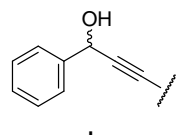









Abbildung 3.31: Zusammenfassung der Synthese von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (55) – Teil 2.

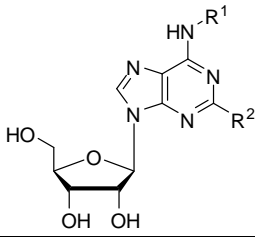
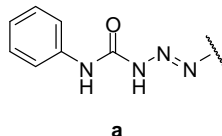
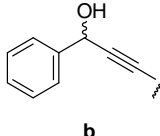
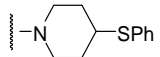

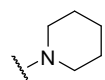
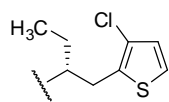
3.9 SYNTHESE VON 5'-CHLOR-5'-DESOXY-N⁶-((1S,2S)-2-FLUOR)CYCLOPENTYLADENOSIN UND 5'-FLUOR-5'-DESOXY-N⁶-((1S,2S)-2-FLUOR)-CYCLOPENTYLADENOSIN

3.9.1 EINLEITUNG

Zunächst wurde in der Literatur nach einer neuen, geeigneten Leitstruktur gesucht. Unter den vielen gängigen Verbindungen, die am A₁-Rezeptor aktiv sind, wurden 19 ausgewählt, die einen K_i-Wert von unter 10 nM aufweisen (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8). Bei den Verbindungen handelt es sich ausschließlich um Adenosin-Derivate. Die meisten der Verbindungen sind in N⁶-Position substituiert. Einige besitzen eine zusätzliche Substitution in Position C2.

Tabelle 3-7: Affinität ausgewählter Adenosin-Analoga an Adenosin-Rezeptoren.

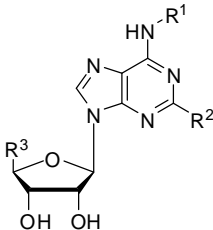
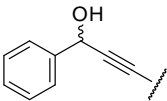

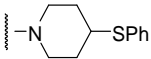
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div>							
Name	R ¹	R ²	A ₁ ^a	A _{2A} ^a	A _{2B} ^b	A ₃ ^a	Lit.
59 CBA		H	3.92 (r)	420 (r)	n. d.	n. d.	⁵²
60 CCBA		Cl	5.30 (r)	460 (r)	n. d.	n. d.	⁵²
4 CCPA		Cl	7.43 (r) 0.8 (h)	640 (r) 2270 (h)	18000 (h)	30 (r) 43 (h)	^{50,52,53}
12 GR79236		H	3.1 (r)	1300 (r)	n. d.	n. d.	²¹⁴
61		F	0.6 (hc)	10100 (rc)	n. d.	n. d.	²¹⁵
62		F	0.9 (hc)	71900 (rc)	n. d.	n. d.	²¹⁵
63		F	1.3 (hc)	19400 (rc)	n. d.	n. d.	²¹⁵
2 R-PIA		H	2.6 (r) 2.04 (h)	117 (r) 860 (h)	11200 (h)	16 (h)	^{50,51}
64		Cl	2.4 (r)	492 (r)	n. d.	n. d.	²¹⁶

  							
Name	R ¹	R ²	A ₁ ^a	A _{2A} ^a	A _{2B} ^b	A ₃ ^a	Lit.
65		Cl	0.9 (r)	470 (r)	n. d.	n. d.	⁵¹
66 TCPA		a	2.8 (h)	210 (h)	600 (h)	10 % bei 10 μM ^c	²¹⁷
67	H	(R,S)-b	0.67 (h)	7.0 (h)	2400 (h)	3.3 (h)	²¹⁸
68 NNC 90-1515		Cl	4.2 (r) 4,7 (r)	1485 (r)	n. d.	n. d.	^{51,214}
69 RG14718		H	0.0057 (r)	13.1 (r)	n. d.	n. d.	²¹⁹

^aK_i-Werte (in nM); ^bEC₅₀-Werte (in nM) aus Adenylatcyclase-Assays; ^c% Inhibition der Radioligand-Bindung; r = Ratte, h = human, hc = DDT1 MF2-Zellen (isolierte, glatte Gefäßmuskelzellen des Vas deferens des Hamsters), rc = Ratten Pheochromocytoma PC-12-Zellen

Fünf der Verbindungen besitzen in 5'-Position keine Hydroxygruppe, sondern eine 5'-Chlor-Funktion oder eine 5'-Carboxamido-Gruppe (siehe Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Affinität ausgewählter 5'-substituierter Adenosin-Analoga an Adenosin-Rezeptoren.

<div><div></div><div></div><div>a</div></div>								
Name	R ¹	R ²	R ³	A ₁ ^a	A _{2A} ^a	A _{2B} ^b	A ₃ ^a	Lit.
70 RG14202		H	CONHEt	1.11 (r)	306 (r)	n. d.	n. d.	54,220
71 PHNECA	H	(<i>R,S</i>)-a	CONHEt	2.7 (h)	3.1 (h)	n. d.	0.42 (h)	218
72	H	(<i>R</i>)-a	CONHEt	1.9 (h)	39 (h)	n. d.	5.5 (h)	218
73	H	(<i>S</i>)-a	CONHEt	2.1 (h)	2 (h)	n. d.	0.75 (h)	218
74 NNC-21 0147		Cl	CH ₂ Cl	3.6 (r)	1150 (r)	n. d.	n. d.	214

^aK_i-Werte (in nM); ^bEC₅₀-Werte (in nM) aus Adenylatcyclase-Assays; r = Ratte, h = human

Obwohl alle gezeigten Verbindungen sehr gute A₁-Rezeptor-Liganden darstellen, sind nicht alle auch gleichermaßen als PET-Ligand-Precursor geeignet. CBA (**59**), CCBA (**60**), CCPA (**4**),

R-PIA (**2**), **65**, TCPA (**66**), NNC 90-1515 (**68**), RG14718 (**69**), RG14202 (**70**) und NNC-21 0147 (**74**) besitzen keine geeignete Position zur schnellen, radioaktiven Markierung. PHNECA (**71**), **72** und **73** sind hingegen zu unselektiv, um als PET-Ligand-Vorläufer dienen zu können. Zweckmäßig sind also nur GR79236 (**12**) und Verbindung **64**, die jeweils eine Hydroxygruppe in der N⁶-Funktion besitzen und die 2-Fluor-substituierten (*S*)-ENBA-Derivate **61**, **62** und **63**.

Die Substitution einer Hydroxygruppe durch Fluor kann, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, durch die Einführung einer Abgangsgruppe ermöglicht werden. Die Substitution eines Fluoratoms durch [¹⁸F]Fluor in 2-Position von Adenosin wurde bereits 2006 von Horti et al. beschrieben.²²¹ Dazu verwendeten sie die konventionelle Methode zur nucleophilen Radiofluorierung in DMSO-Lösung bei 150 °C.

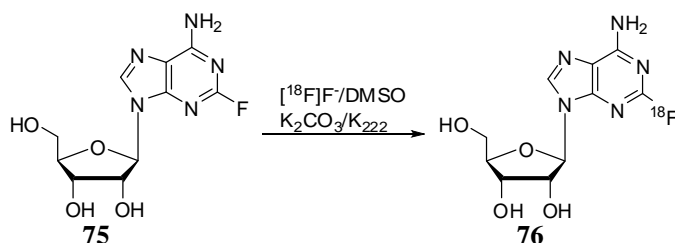


Abbildung 3.32: Radiosynthese von 2-[¹⁸F]Fluoradenosin.²²¹

Da Horti et al. jedoch eine teilweise Zersetzung des Eduktes zu einem nicht-identifizierten Nebenprodukt während der Reaktion nachweisen konnten, wurden die (*S*)-ENBA-Derivate ebenfalls nicht als Vorläufermoleküle in Betracht gezogen.²²¹ Die beiden verbliebenen Verbindungen GR79236 (**12**) und Verbindung **64** unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften kaum. Beide besitzen eine Affinität zum A₁-Rezeptor im niedrigen nanomolaren Bereich. Die Selektivität gegenüber dem A_{2A}-Rezeptors ist für beide ausreichend, die Affinitäten an den anderen Rezeptoren sind bisher noch nicht bestimmt worden. Beide Moleküle wären also gleichermaßen als Vorläufermoleküle geeignet. Die Auswahl wurde deshalb anhand der Synthese-Route und der Verfügbarkeit der Reagenzien zugunsten von GR79236 (**12**) getroffen. Eine zusätzliche Substitution des Moleküls mit Chlor oder Fluor in 5'-Position verhindert die Eliminierung der 5'-Hydroxygruppe während der späteren Fluorierung. Außerdem erhöht sie die Lipophilie, die eine bessere Durchgängigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke bewirken könnte, und verhindert den Einbau der Verbindung in die RNA. In verschiedenen Literaturstellen sowie durch eigene Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Chlorierung bzw. Fluorierung in 5'-Position vermutlich keinen Aktivitätsverlust verursachen wird (siehe Tabelle 3-6).²²² Als mögliche neue PET-Liganden sollten also die in Abbildung 3.33 dargestellten Verbindungen synthetisiert werden.

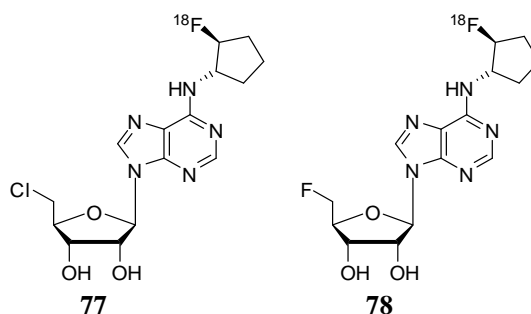


Abbildung 3.33: Strukturen der beiden potentiellen PET-Liganden 5'-Chlor-5'-deoxy-N⁶-((1S,2S)-2-fluor)cyclopentyladenosin (**77**) bzw. 5'-Fluor-5'-deoxy-N⁶-((1S,2S)-2-fluor)cyclopentyladenosin (**78**).

3.9.2 SYNTHESE

Da die Synthese der Verbindungen **77** und **78** derjenigen von Verbindung **55** recht ähnlich ist, konnten einige bereits etablierte Vorschriften übernommen werden. Erneut wurde Inosin (**35**) als Ausgangsmaterial verwendet. Im ersten Schritt erfolgte ebenfalls eine Schützung der *cis*-ständigen, vicinalen Ribose-Hydroxygruppen und die Aktivierung des Lactamrings durch Chlorierung (siehe Abbildung 3.34). Im Gegensatz zur Synthese des oben beschriebenen Vorläufermoleküls, bei der die verwendeten Acetyl- bzw. Benzoylschutzgruppen zeitgleich mit der Aminierung der N⁶-Position durch Cyclopentylamin abgespalten wurden, müssen in dieser Synthese die Hydroxyschutzgruppen jedoch nach der Chlorierung sofort wieder entfernt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für die Synthese der Verbindungen **77** und **78** ein enantiomerenreines und damit sehr viel teureres Amin verwendet werden muss. Aus diesem Grund wurde, statt der früher verwendeten Acetyl- bzw. Benzoylschutzgruppe, die Trifluoracetyl-Gruppe zur transienten Schützung der Hydroxygruppen verwendet. Die elektronenziehenden Fluorsubstituenten der Trifluoracetyl-Gruppe erleichtern deren spätere Abspaltung. Zunächst wurde deshalb Inosin nach der von Robins et al. entwickelten Methode mit Trifluoracetanhydrid in Dichlormethan 16 h bei Raumtemperatur umgesetzt (siehe Abbildung 3.34).²²³ Für die anschließende Chlorierung wurde die erhaltene Verbindung ohne Aufreinigung in Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit einer Mischung aus Thionylchlorid und DMF versetzt. Es entstand eine weiße, zähe und voluminöse Suspension. Diese wurde 16 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend unter vermindertem Druck auf die Hälfte eingeeengt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Das Produkt wurde durch Extraktion mit Dichlormethan gewonnen (siehe Abbildung 3.34). Die Trifluoracetatgruppen konnten nach der Chlorierung leicht durch Methanolyse gespalten werden (siehe Abbildung 3.34). Die Ausbeute über alle drei Reaktionen betrug 50 %.

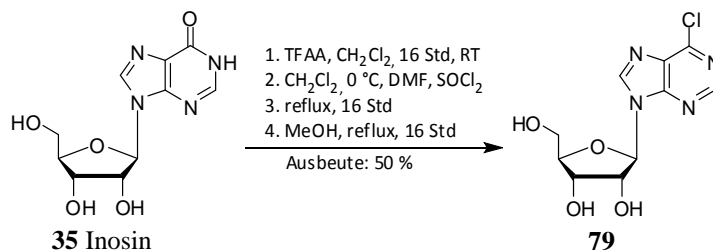


Abbildung 3.34: Darstellung von 6-Chlor-9-(β-D-ribofuranosyl)purin (79).²²³

Das Chlorpurin wurde dann in Gegenwart von Triethylamin als Hilfsbase mit dem enantiomerenreinen (1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentylamin (**80**) umgesetzt, wodurch das Adenosin-Derivat (**81**) entstand. Die Benzyl-Schützung der Cyclopentyl-Hydroxygruppe ermöglichte eine nachfolgende Substitution der 5'-Hydroxygruppe.

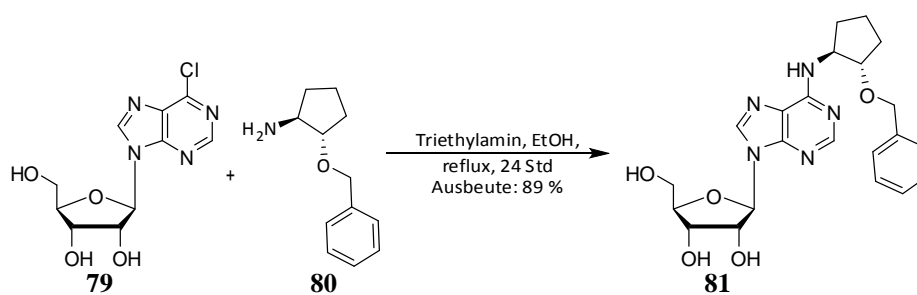


Abbildung 3.35: Darstellung von *N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyladenosin (**81**).

Die Modifikation der 5'-Position erfolgte dann aus Verbindung **81** separat für das jeweilige Chlor- bzw. Fluor-Derivat.

Für die Synthese des Chlor-Derivates (**77**) wurde Verbindung **81** mit Thionylchlorid in Acetonitril und Pyridin als Base umgesetzt (siehe Abbildung 3.36).²²⁴ Nach Aufarbeitung der Reaktion wurde eine Mischung von zwei Verbindungen erhalten (siehe Abbildung 3.36). Durch LCMS-Analyse konnten diese beiden Verbindungen identifiziert werden. Bei der einen handelt es sich um das erwartete Produkt *N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-(benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin (**82**). Die andere Verbindung entspricht *N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-(benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (**83**), bei welchem die 2'- und 3'-Hydroxygruppen nicht als Sulfit geschützt sind. Da in der nächsten Reaktion die Schutzgruppe wieder entfernt werden sollte, wurden die beiden Produkte nicht voneinander getrennt, sondern in dieser Mischung mit Methanol und Ammoniumhydroxid umgesetzt (siehe Abbildung 3.36).²²⁴ Die Ausbeute betrug 64 % über beide Stufen.

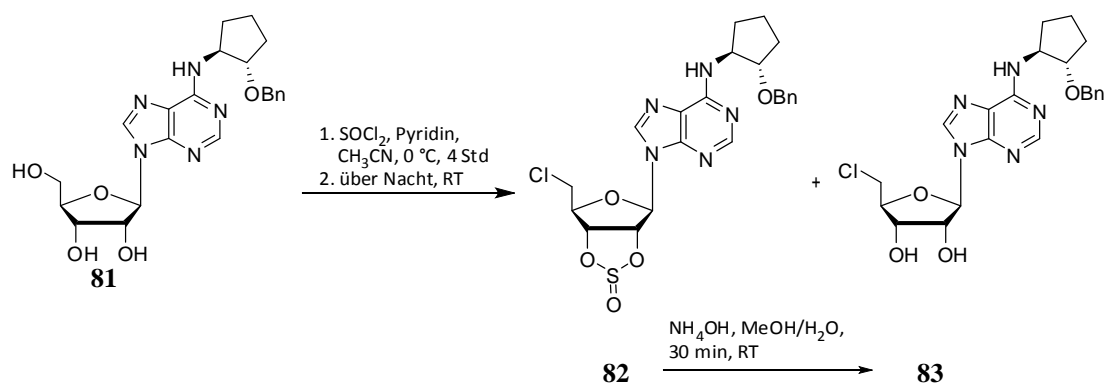


Abbildung 3.36: Darstellung von *N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin (**82**) und *N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (**83**).²²⁴

Im nächsten Schritt wurde die Hydroxygruppe des Cyclopentyl-Substituenten entschützt. Dazu wurde Verbindung **83** in Methanol gelöst, mit Pearlman's Katalysator (Palladiumhydroxid auf Aktivkohle) versetzt und am Wasserstoffgenerator katalytisch hydriert (siehe Abbildung 3.37).²²⁵ Das Produkt (**84**) wurde in einer Ausbeute von 97 % erhalten.

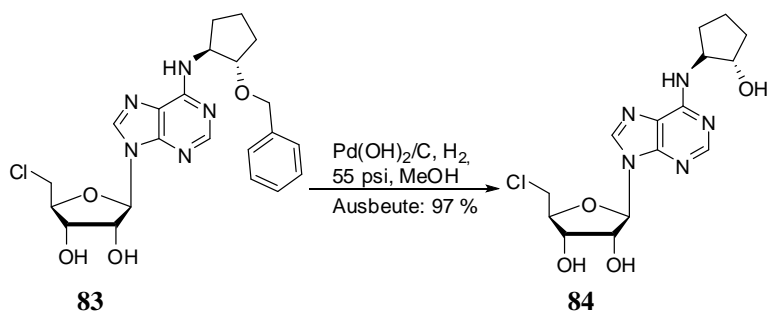


Abbildung 3.37: Darstellung von *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (**84**).²²⁵

Vor der Modifikation der Hydroxy-Funktion mussten erneut die *cis*-ständigen 2'- und 3'-Hydroxygruppen adäquat geschützt werden. Dazu wurde erneut die bereits vorher eingesetzte *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe verwendet. Zur Einführung dieser Schutzgruppe wurde Verbindung **84**, wie von Marwood et al. beschrieben, mit *p*-Methoxybenzaldehyd in Dichlormethan unter Zugabe von Triethylorthoformiat und *p*-Toluensulfonsäure umgesetzt.²⁰² Nach Aufarbeitung der Reaktionsmischung konnte das erwartete Produkt jedoch nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden.

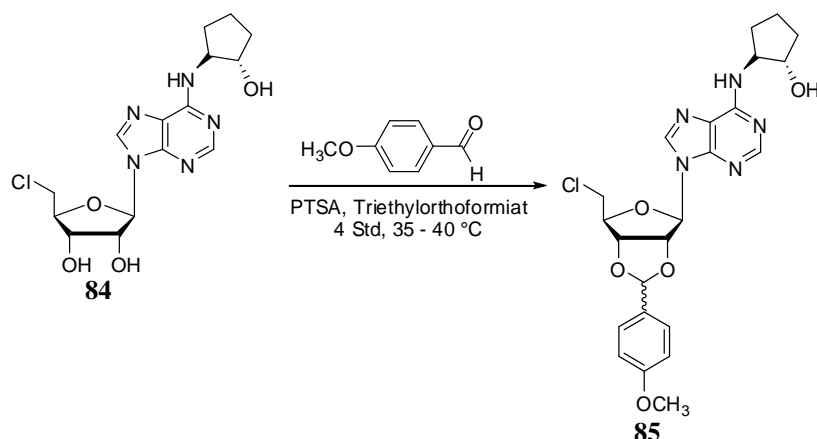


Abbildung 3.38: Vorschrift zur Darstellung von 5'-Chlor-5'-desoxy-2',3'-O-p-methoxybenzyliden-N⁶-(2-hydroxy)cyclopentyladenosin (85) nach Marwood.²⁰²

Das LCMS-Spektrum zeigt stattdessen als Hauptprodukt eine Verbindung mit einer um 62 niedrigeren Molekülmasse.

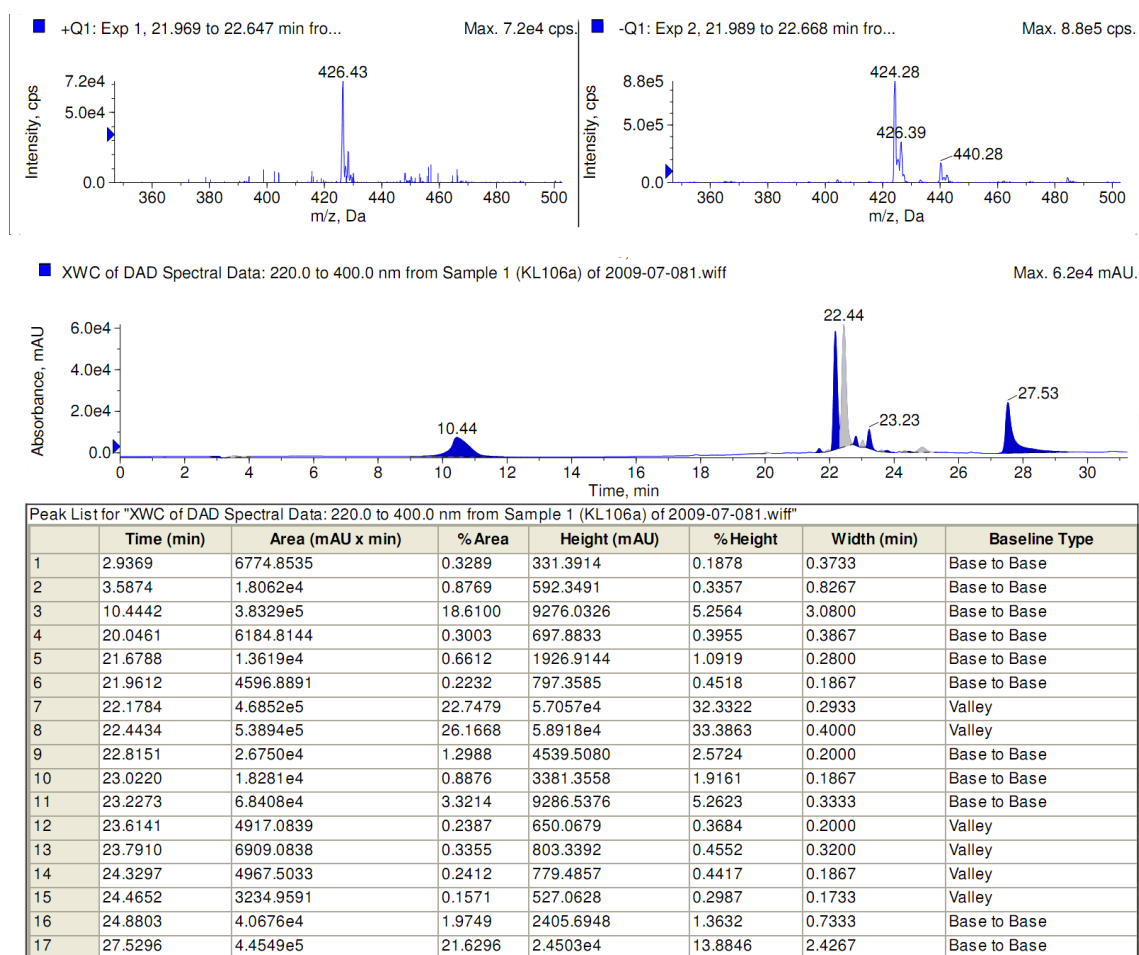


Abbildung 3.39: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) des Produktes der Synthese von Verbindung 85.

Eine Strukturaufklärung mit Hilfe verschiedener NMR-Messtechniken (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC, HSQC) wurde durch ein Stereozentrum im Molekül, das zur Bildung zweier Isomere und damit zu einer Verdopplung der Signale der Riboseeinheit führt, erschwert. Die beiden Isomere sind auch im LC/ESI-MS-Spektrum zwischen 21,9 und 22,7 min gut zu erkennen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sieht man, dass sowohl das Adenosin-Grundgerüst als auch die Cyclopentyl-einheit intakt sind (siehe Abbildung 3.40). Der aromatische Ring ist jedoch nur zum Teil erkennbar. Erwartet wurden insgesamt vier Signale bei etwa 160 ppm für Kohlenstoff **E** (zur Nummerierung siehe Strukturformel in Abbildung 3.40), 129 ppm für **B**, 127 ppm für **D**, und 114 ppm für **C**. In früheren und späteren Synthesen zu 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-geschützten Adenosin-Derivaten konnte dieses Muster bestätigt werden.

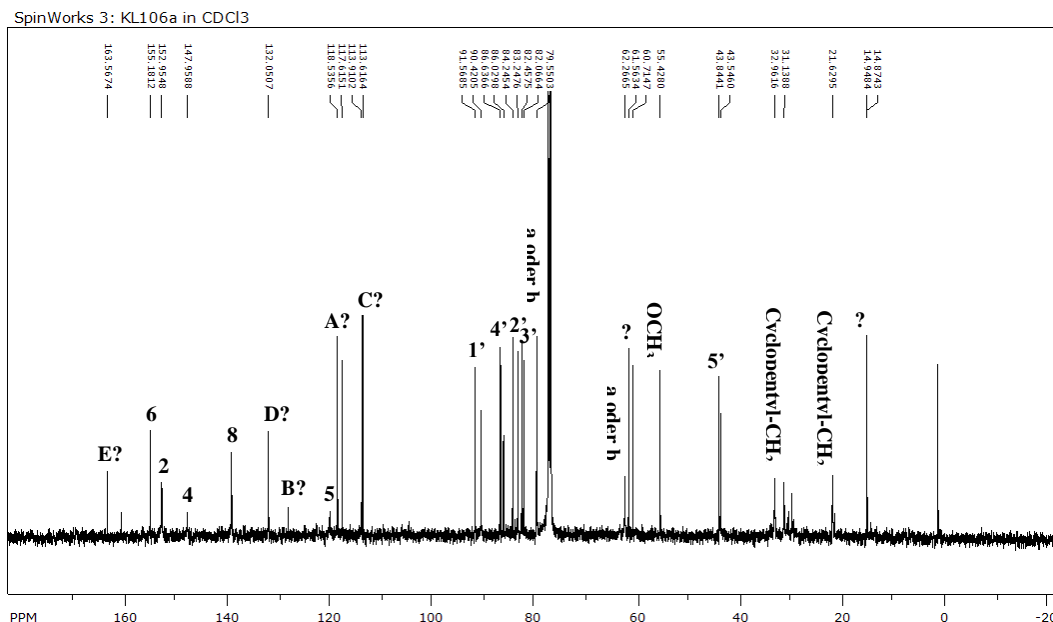
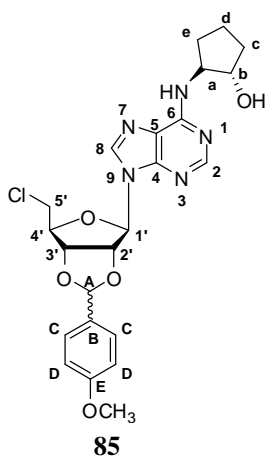


Abbildung 3.40: ^{13}C -NMR-Spektrum der Synthese von Verbindung **85** nach Marwood.

Sichtbar sind stattdessen ein Signal bei etwa 164 ppm und ein Signal bei etwa 114 ppm. Diese könnten den Kohlenstoffen **E** und **C** entsprechen. Ferner erkennt man ein Signal bei 132 ppm, welches zwar theoretisch die aromatischen Methylengruppen **D** darstellen könnte, jedoch um einige ppm zu hoch liegt. Außerdem sieht man ein sehr kleines Signal bei 128 ppm, welches in einem zweidimensionalen CH-heteronuclear korrelierten NMR-Spektrum (heteronuclear single quantum correlation, HSQC) keine CH-Kopplung zeigt. Es handelt sich also um ein quartäres Kohlenstoff-Atom und könnte somit **B** entsprechen. Weiterhin erkennt man deutlich die Verdopplung der Signale der Riboseeinheit im Bereich zwischen 80 und 100 ppm. Diese Verdopplung der Signale entsteht durch den Einfluss des Stereozentrums (**A** in Abbildung 3.40). Die Methoxyfunktion ist als Signal mit einer Verschiebung von etwa 55 ppm jedoch nur mit einem Integral von 1 sichtbar. Weiterhin erkennt man auch eine Methylgruppe bei 14 ppm, sowie zwei Signale bei ca. 60 ppm, die Methylengruppen darstellen. Diese drei Signale lassen sich keiner Struktur des Moleküls zuordnen und es ist nicht genau feststellbar, ob diese Signale zum Molekül oder einer etwaigen Verunreinigung (z. B. Ethylacetat) gehören.

Im ¹H-NMR Spektrum (siehe Abbildung 3.41) erkennt man die typischen, breiten Signale der Methylengruppen des Cyclopentylrestes, die beiden CH-Gruppen des Adenin-Grundgerüsts sowie die Signale der Ribose im Bereich zwischen 4 und 6 ppm. Außerdem sieht man auch in diesem Spektrum die Verdopplung der Ribose-Signale durch das Stereozentrum **A** des Moleküls. Jedes dieser doppelten Signale weist ein Integral von 0,5 auf. Die 2-Hydroxycyclopentyl-substituierte Adenosin-Grundstruktur ist also erhalten. Durch HSQC-Kopplungsexperimente konnte herausgefunden werden, dass das Dublett bei 6,9 ppm dem Proton von Kohlenstoff **C** und das Dublett bei 8,0 ppm dem von Kohlenstoff **D** entspricht. Jedoch weisen beide nur ein Integral von 1 auf. Beide Signale müssten jedoch ein Integral von 2 besitzen, da der *p*-Methoxybenzyliden-Rest symmetrisch aufgebaut ist. Außerdem ist das Signal bei 8,0 ppm für Kohlenstoff **D** des Aromaten ungewöhnlich stark Tieffeld-verschoben. In allen anderen ¹H-NMR-Spektren von vorher oder nachher synthetisierten 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-geschützten Adenosin-Derivaten zeigte diese Gruppe nur eine Verschiebung von etwa 7,5 ppm. Die Spektren lassen also den Schluss zu, dass es vermutlich nicht zu einer korrekten Schützung der 2'- und 3'-Hydroxygruppen gekommen ist. Weiterhin erkennt man auch zwei Methylgruppen bei 1,4 ppm, sowie zwei Methylenprotonen im Bereich zwischen 3,5 und 4 ppm. Diese drei Gruppen, die auch schon im ¹³C-Spektrum sichtbar waren, lassen sich keiner Struktur des Moleküls zuordnen und es ist nicht genau feststellbar, ob diese Signale zum Molekül oder einer etwaigen Verunreinigung (z. B. Ethylacetat) gehören.

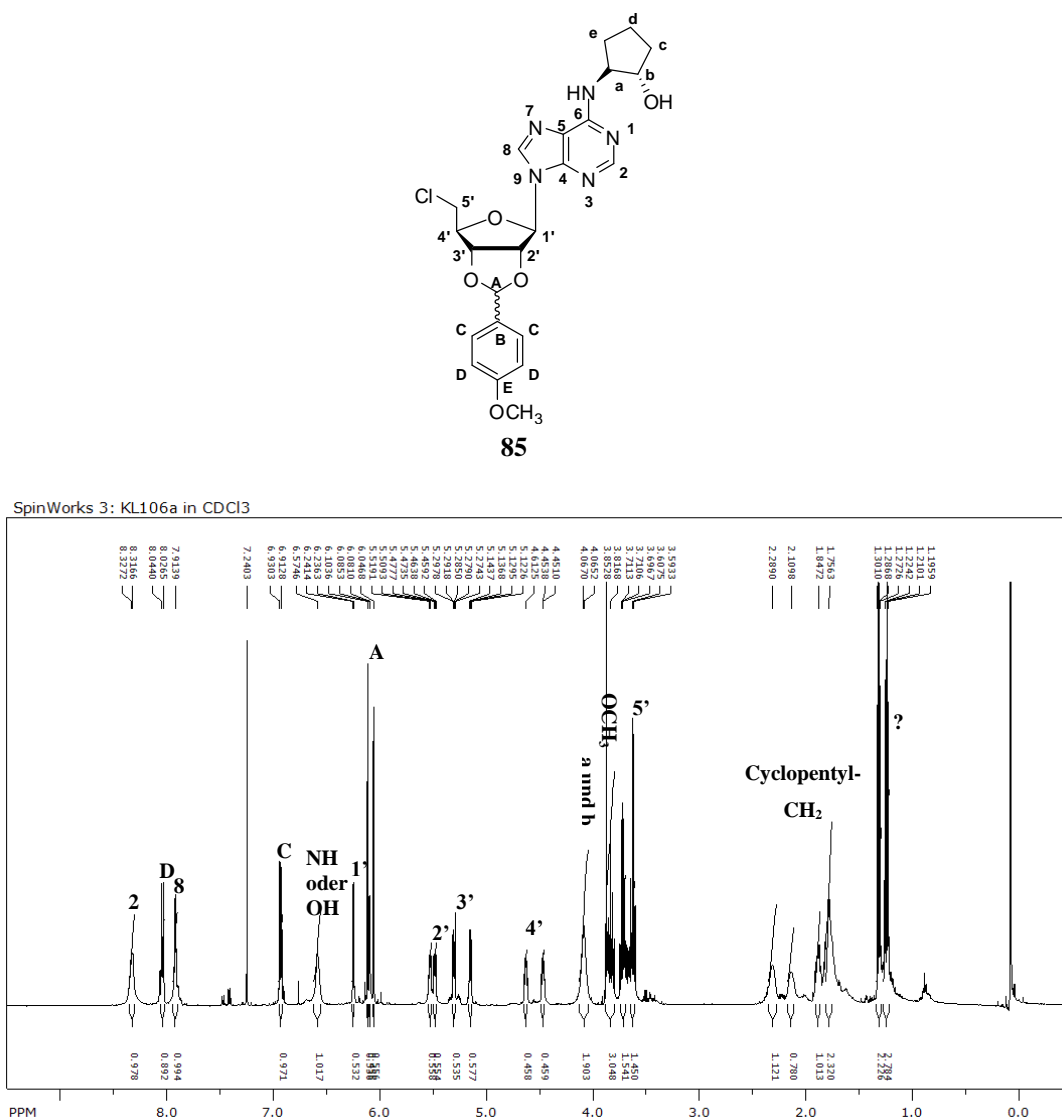


Abbildung 3.41: ¹H-NMR Spektrum der Synthese von Verbindung **85** nach Marwood.

Da mit der Methode von Marwood et al. als bevorzugtes Produkt nicht Verbindung **85** gebildet wurde, wurde Verbindung **84** erneut nach der bereits vorher beschriebenen Methode nach Riley et al. umgesetzt.²⁰¹ Diese Vorschrift konnte bereits erfolgreich für die Schützung von Adenosin genutzt werden. Bei der Methode nach Riley et al. wird als Reagenz statt Anisaldehyd das Dimethylacetal des Anisaldehyds verwendet. Dadurch entstand bei der Schützung kein Wasser, welches die Rückreaktion fördert, sondern Methanol, welches mittels einer Destillationsapparatur entfernt werden konnte. Ein LCMS-Spektrum bestätigte die Identität der gewünschten Verbindung. Die Reaktionsmischung wurde zunächst säulenchromatographisch mit Dichlormethan : Ethanol (95 : 5) als Eluenten gereinigt.

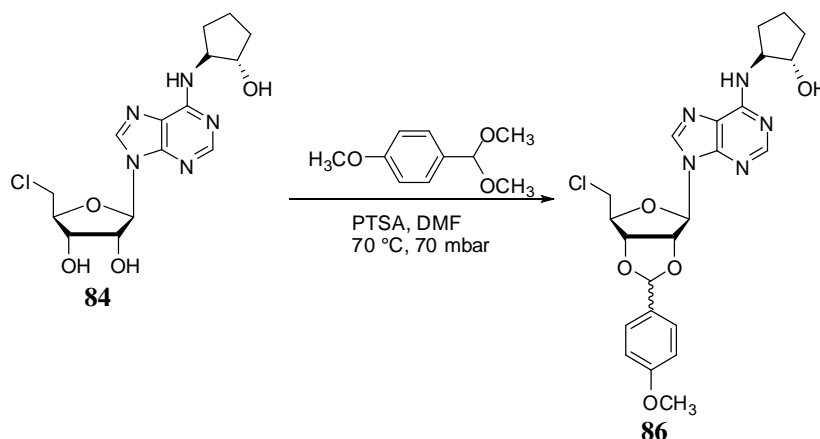


Abbildung 3.42: Vorschrift zur Darstellung von 5'-Chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzyliden-*N*⁶-(2-hydroxy)cyclopentyladenosin (85) nach Riley.²⁰¹

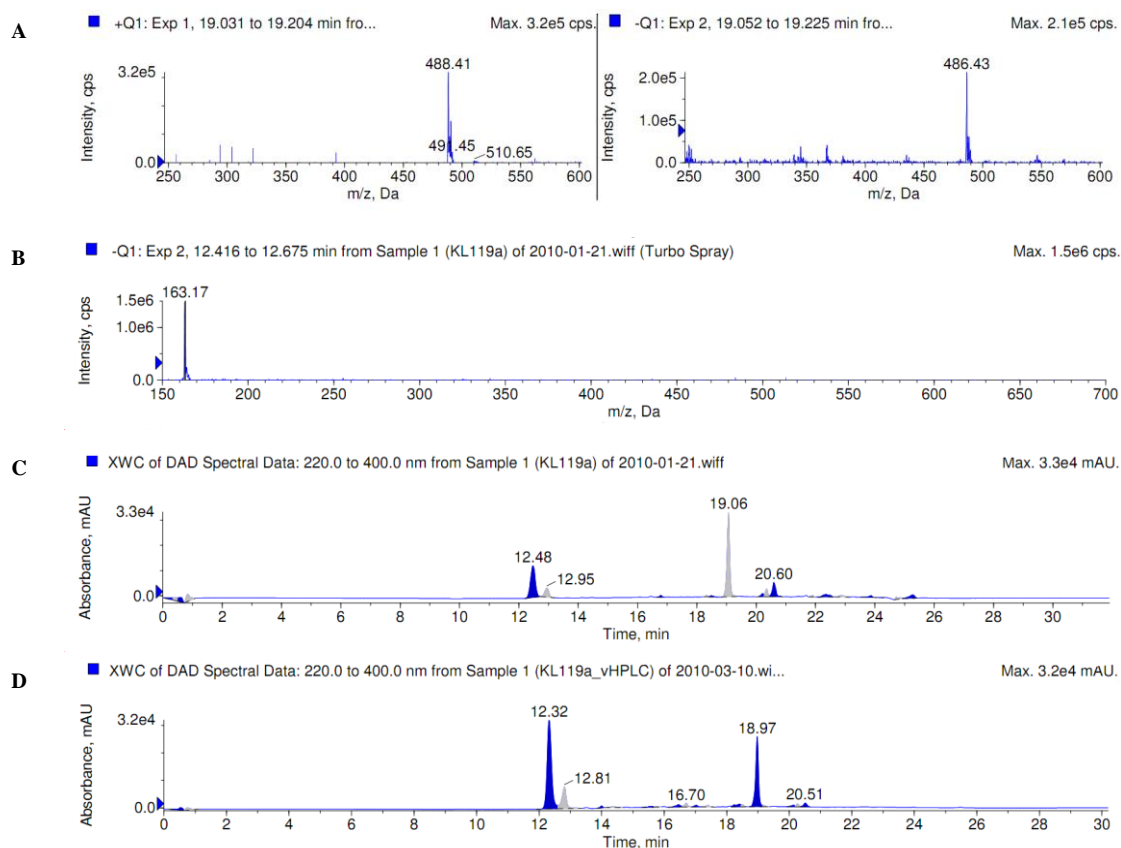


Abbildung 3.43: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) von Verbindung 85 nach Riley. A) Produktpeak; B) Nebenprodukt; C) UV-Spektrum der Reaktionsmischung vor Behandlung mit Triethylamin; D) UV-Spektrum der Reaktionsmischung nach Behandlung mit Triethylamin.

Trotz gut unterscheidbarer R_f -Werte der einzelnen Komponenten konnte aber keine ausreichende Trennung erreicht werden. Vermutlich löst sich das Produkt teilweise in dem Reagenz *p*-Methoxybenzaldehyd Dimethylacetal. Damit bildeten sich teilweise Mischfraktionen. Die Fraktionen, die das überschüssige *p*-Methoxybenzaldehyd Dimethylacetal enthielten, wurden

verworfen. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden wieder vereint und erneut mit Dichlormethan : Ethanol (95 : 5) säulenchromatographisch gereinigt. Laut dünnschichtchromatographischer Analyse wurde nur das Produkt isoliert. Eine LCMS-Analyse zeigte jedoch lediglich einen Gehalt von etwa 45 %. Eine Kristallisation der Verbindung aus verschiedenen Mischungen von Ethylacetat und Petrolether bzw. Diethylether blieb erfolglos. Deshalb wurde anschließend versucht, Verbindung **85** durch HPLC aufzureinigen. Zur Untersuchung der Stabilität und der Löslichkeit des Produktes im Laufmittel wurde die Substanz zunächst mit einer Mischung aus 19,75 % Methanol : 79,75 % Wasser : 0,5 % Triethylamin versetzt, eingedampft und säulenchromatographisch getrennt. Die anschließende LCMS-Analytik ergab, dass der Anteil an Produkt in dieser Mischung noch geringer ist. Vermutlich kommt es durch die Zugabe der Base Triethylamin zu einer teilweisen Zersetzung oder Umlagerung, sodass eine Trennung unter Zugabe der Base nicht möglich war (vgl. Abbildung 3.43C und Abbildung 3.43D).

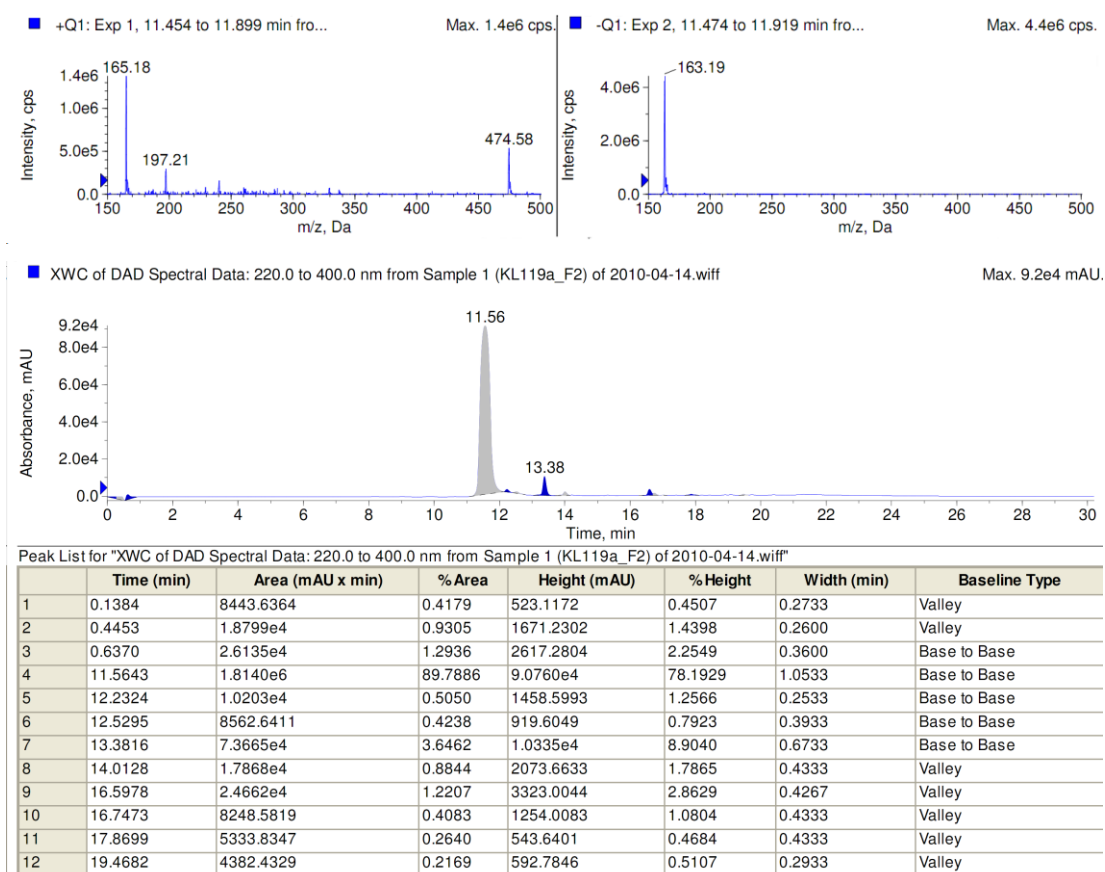


Abbildung 3.44: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der ersten HPLC-Fraktion von Verbindung **85.**

Stattdessen wurde Verbindung **85** mit 40 % Methanol : 60 % Wasser versetzt, erhitzt, abgekühlt und durch einen Sterilfilter filtriert. Das Filtrat wurde über eine RP-HPLC-Säule mit einem Lösungsmittelgradienten von 40 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer

35 min) aufgereinigt. Es wurden vier Fraktionen getrennt, von denen zwei gesammelt und analysiert wurden. Die erste gesammelte Fraktion stellte eine nicht identifizierte Verbindung der Molekülmasse 164 g/mol und damit den Peak bei 12,47 min bzw. 12,32 min im vorher gemessenen LCMS-Spektrum (vgl. Abbildung 3.44 mit Abbildung 3.43) dar. Die zweite Fraktion bestand aus Verbindung **85**.

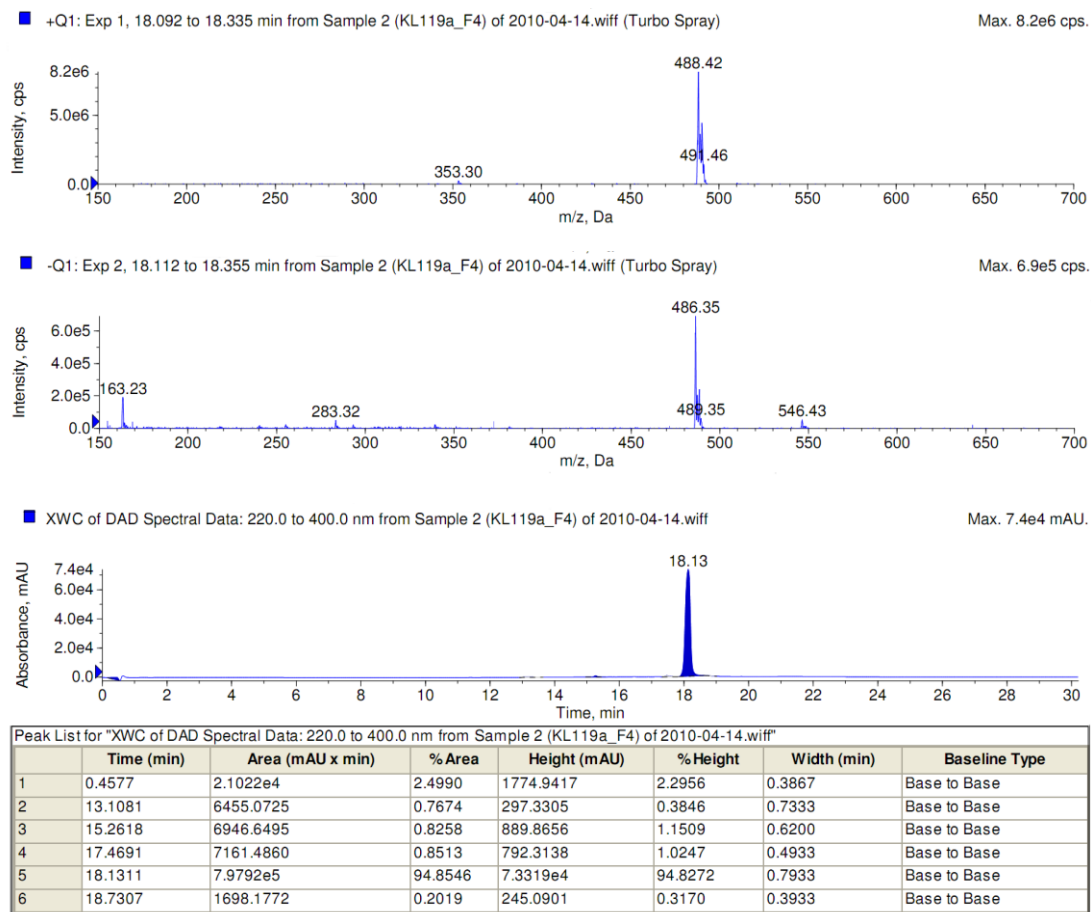


Abbildung 3.45: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der zweiten HPLC-Fraktion von Verbindung **85.**

Die beiden anderen Fraktionen fielen nur in so geringer Menge an, dass eine Analyse nicht möglich war. Aus 200 mg Startmaterial konnten nur 13 mg des Produktes sauber isoliert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Verbindung **85** sich nur sehr schwer in anderen Lösungsmitteln als Dichlormethan, v. a. aber polaren Solvenzien lösen lässt. Der Hauptteil der Verbindung wird bei der Sterilfiltration aus der Suspension entfernt. Eine gute bis sehr gute Reinheit ist jedoch notwendig, da als nächster Schritt die Mesylierung des Produktes erfolgen würde. Es ist zu erwarten, dass die Mesylverbindung wieder sehr instabil sein wird und so eine Aufreinigung nur schwer möglich ist. Deshalb ist es essentiell, dass Verbindung **85** in einer ausreichenden Menge vorliegt und eine größtmögliche Reinheit aufweist. Da dies nicht erreicht werden konnte, war eine weitere Umsetzung der Verbindung ausgeschlossen.

Eine Zusammenfassung der bis dahin absolvierten Reaktionen ist in Abbildung 3.46 dargestellt.

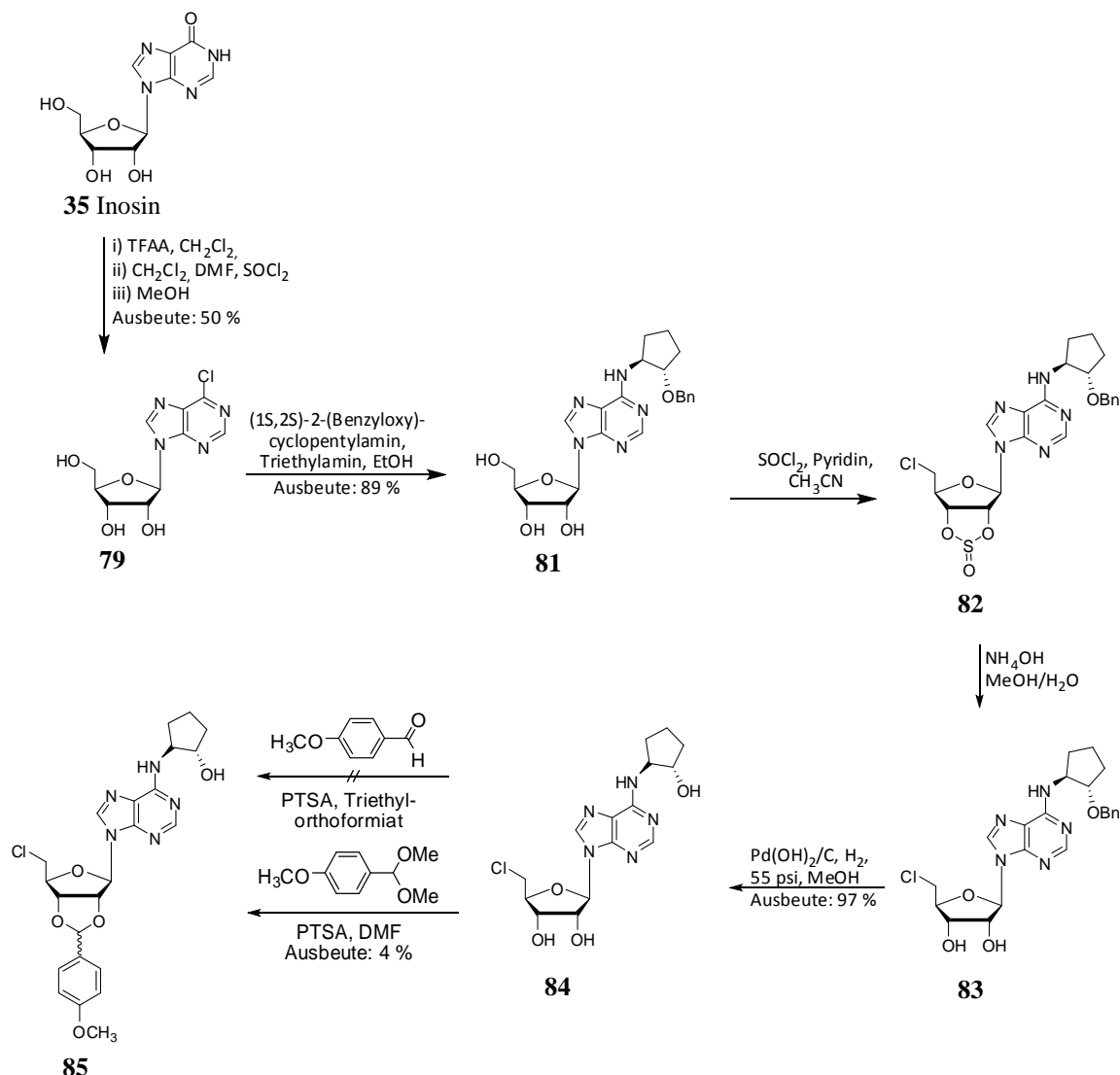


Abbildung 3.46: Zusammenfassung der Synthese von 5'-Chlor-5'-desoxy-2',3'-O-*p*-methoxybenzyliden-*N*⁶-(2-hydroxy)cyclopentyladenosin (**85**).

Wie in Kapitel 3.9.1 berichtet, könnte auch 5'-Fluor-5'-desoxy-*N*⁶-((1S,2S)-2-fluor)cyclopentyladenosin (**78**) als PET-Ligand Verwendung finden. Dessen Synthese erfolgte in den ersten Reaktionen bis zur Synthese von Verbindung **81** analog zu der des Chlor-Derivates. Für die anschließende Modifikation der 5'-Hydroxyfunktion mussten dann zunächst die 2'- und 3'-Hydroxyfunktionen der Riboseeinheit geschützt werden. Als Schutzgruppe sollte auch hier die *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe verwendet werden. Die Synthese, ausgehend von *N*⁶-(1S,2S)-2-(benzyloxy)cyclopentyladenosin (**81**), wurde nach der Vorschrift von Marwood et al. in einem parallelen Experiment zur Synthese von **85** durchgeführt.²⁰² Das LCMS Spektrum des isolierten Produktes zeigte jedoch auch hier eine Verbindung, deren Molekulargewicht um 62 kleiner war, als die des gewünschten Produktes (siehe Abbildung 3.48).

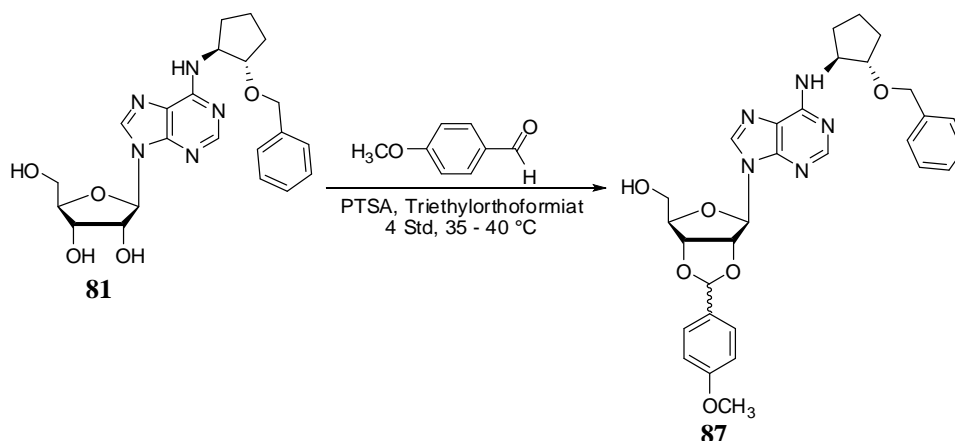


Abbildung 3.47: Vorschrift zur Darstellung von 5'-Chlor-5'-desoxy-2',3'-O-*p*-methoxybenzyliden-*N*⁶-(2-hydroxy)cyclopentyladenosin (87) nach Marwood.²⁰²

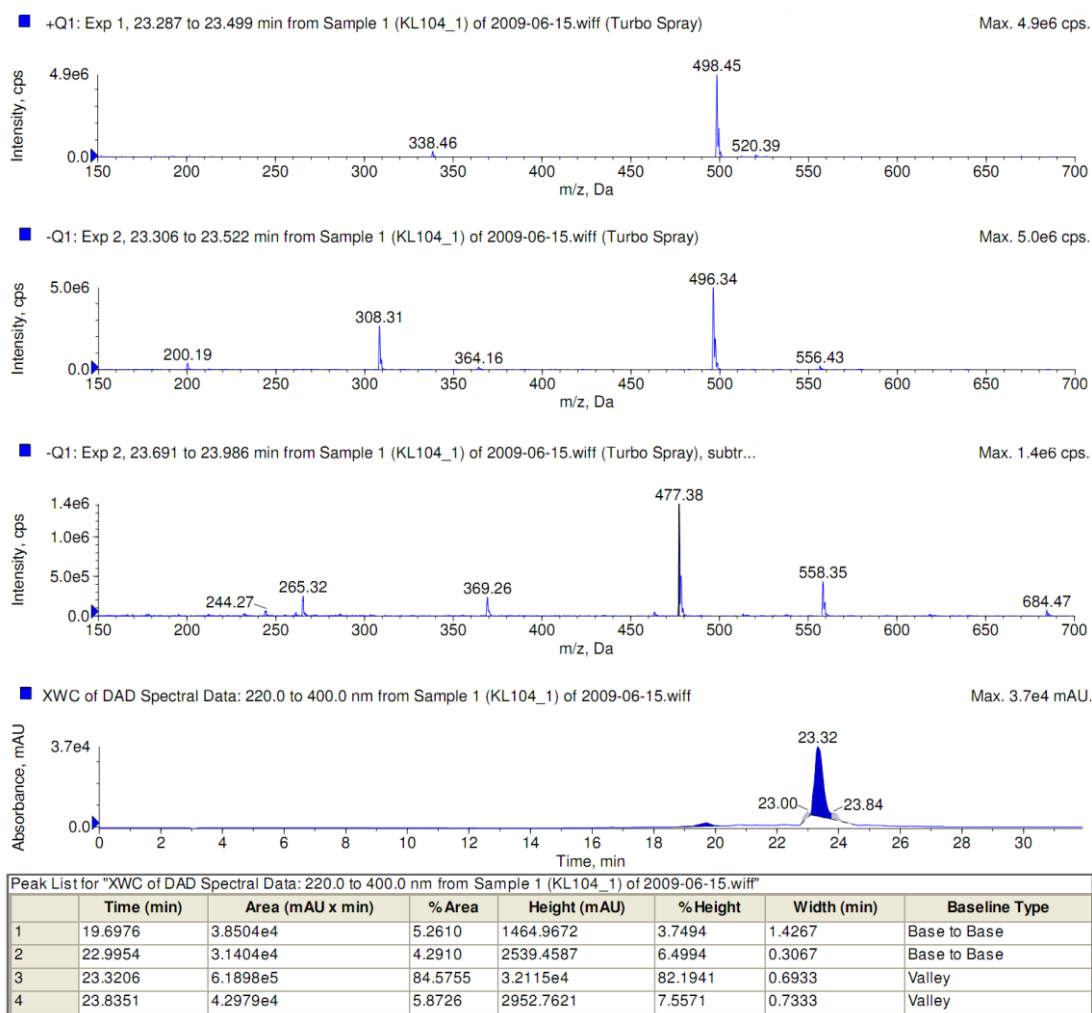


Abbildung 3.48: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der Synthese von Verbindung 87.

Eine vollständige Analytik der isolierten Verbindung analog zu Verbindung **85** (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC, HSQC) sollte Aufschluss darüber geben, ob bei dieser Synthese eine analoge Reaktion wie bei **85** stattgefunden hatte.

In Abbildung 3.49 erkennt man deutlich die große Ähnlichkeit aber auch Unterschiede zu dem ^{13}C -Spektrum in Abbildung 3.40.

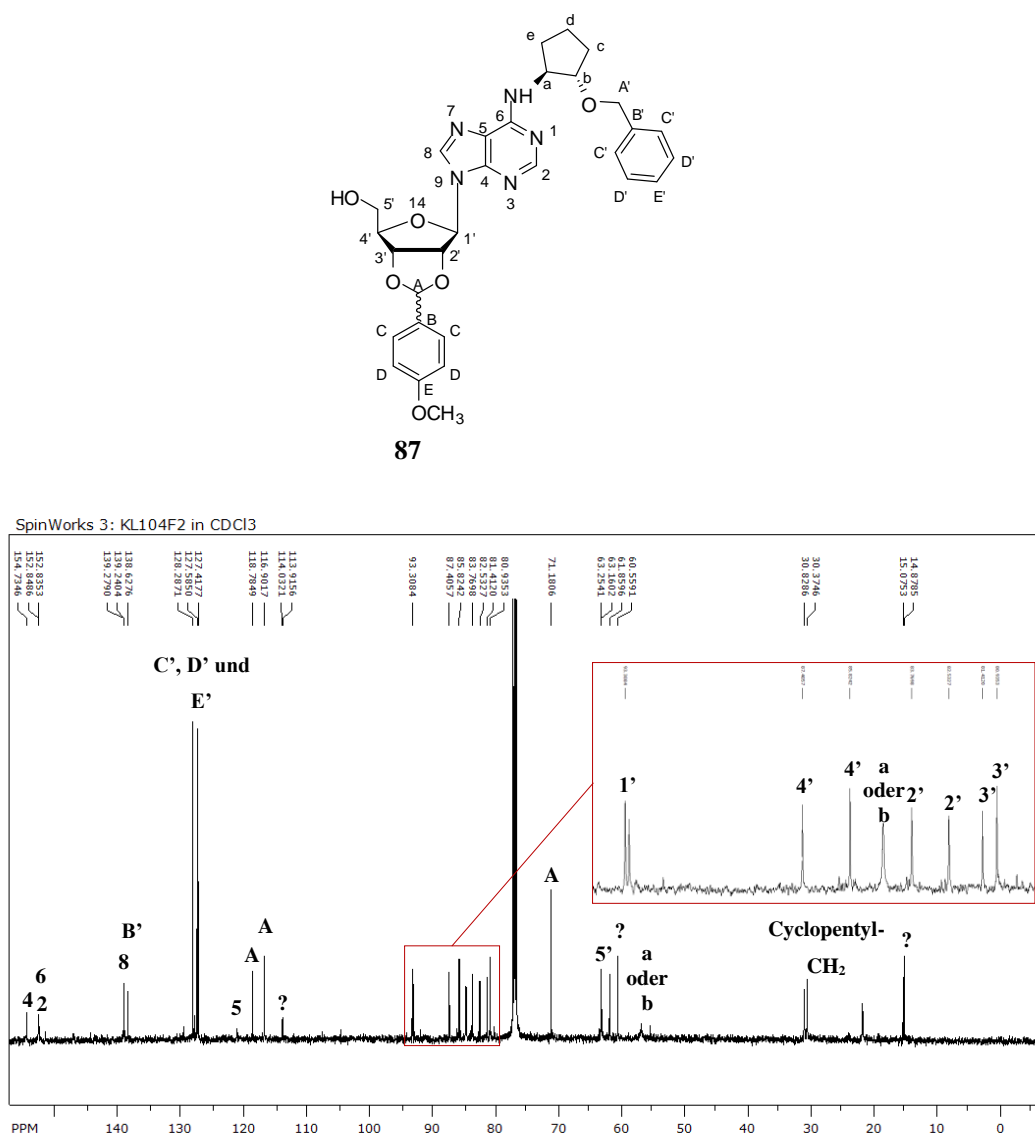
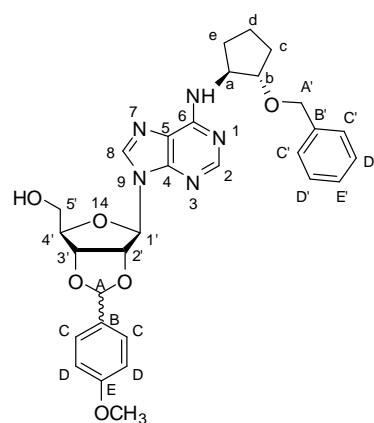


Abbildung 3.49: ^{13}C -NMR Spektrum der Synthese von Verbindung **87** nach Marwood.

Zum einen erkennt man das Vorhandensein der Cyclopentyl-CH₂-Gruppen zwischen 20 und 30 ppm, sowie die Kohlenstoff-Atome der Ribose und des Adeningerüsts. Das Adenosin-Grundgerüst sowie der Cyclopentyl-Substituent sind folglich intakt. In diesem Spektrum erkennt man weiterhin drei Signale im Bereich um 130 ppm. Diese Signale sowie das Signal bei 138 ppm lassen sich der Benzylschutzgruppe des 2-Hydroxycyclopentyl-Substituenten zuordnen.



87

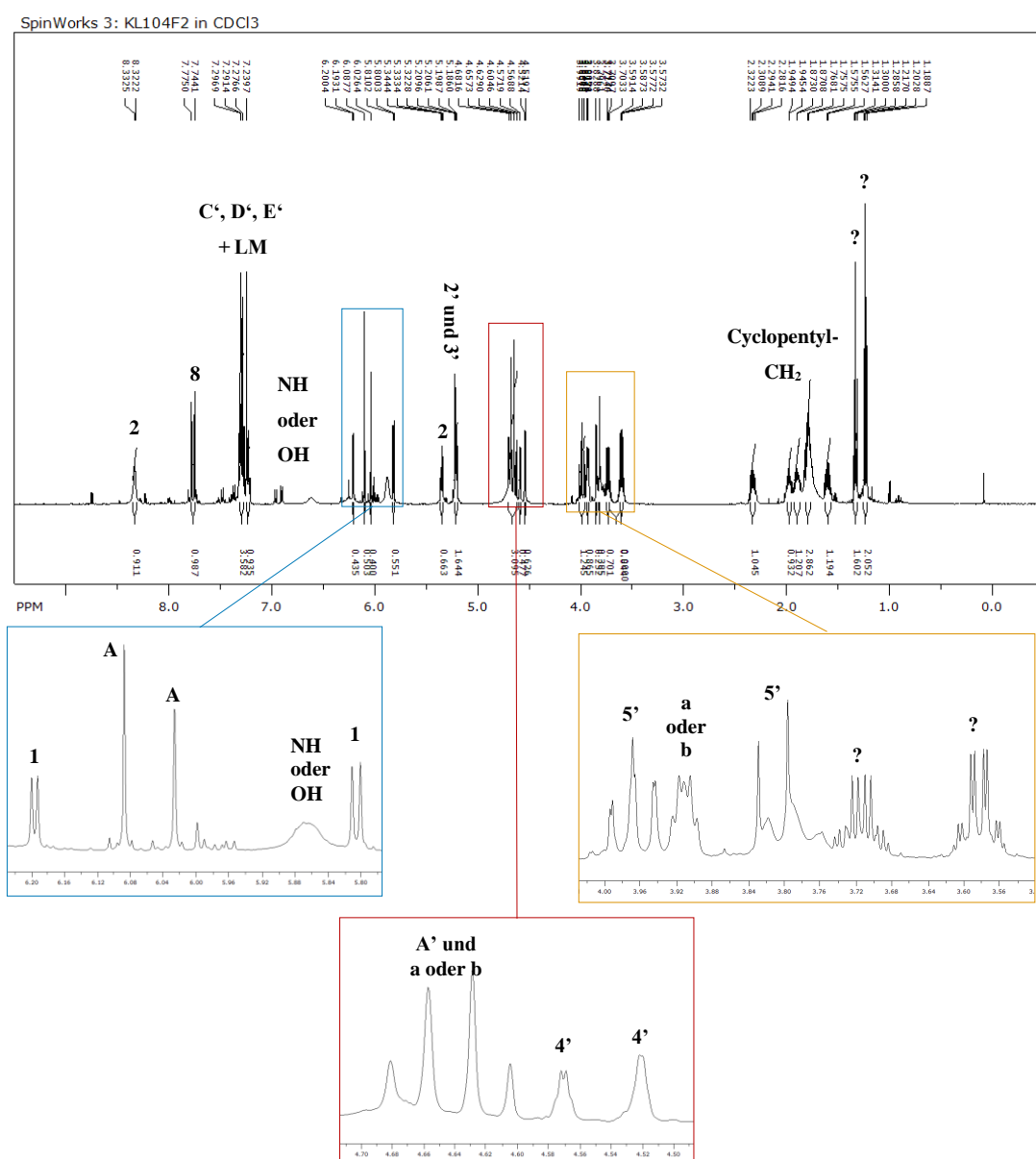


Abbildung 3.50: ¹H-NMR Spektrum der Synthese von Verbindung 87 nach Marwood.

Außerdem erkennt man deutlich die Verdopplung der Signale der Riboseeinheit im Bereich zwischen 80 und 100 ppm. Diese Verdopplung der Signale entsteht durch den Einfluss des Stereozentrums (**A** in Abbildung 3.49). Im Unterschied zum ¹³C-Spektrum von Verbindung **85** sind in diesem Spektrum jedoch keine weiteren aromatischen Kohlenstoffe detektiert worden, die auf das Vorhandensein der *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe hinweisen. Auch das Signal bei 160 ppm, welches dem quartären Kohlenstoff-Atom **E** entsprechen würde, sowie die Methoxygruppe, deren Signal bei etwa 55 ppm liegen sollte, sind nicht detektierbar.

Im ¹H-NMR Spektrum (siehe Abbildung 3.50) erkennt man ebenfalls die typischen, breiten Signale der Methylengruppen des Cyclopentylrestes, die beiden CH-Gruppen des Adenin-Grundgerüsts sowie die sich teilweise überlappenden Signale der Ribose im Bereich zwischen 4 und 6 ppm. Außerdem sieht man auch in diesem Spektrum (vgl. Abbildung 3.41) die Verdopplung der Ribose-Signale bedingt durch das Stereozentrum **A** des Moleküls. Die Adenosin-Grundstruktur sowie der N⁶-Substituent sind folglich erhalten. Im Bereich um 7,3 ppm sind jedoch nur fünf Protonen erkennbar, die alle der Benzylschutzgruppe zugeordnet werden können. Auch die sehr charakteristische Methoxygruppe der *p*-Methoxybenzylidenschutzgruppe ist in diesem Spektrum nicht detektiert worden. Dies lässt den Schluss zu, dass es vermutlich nicht zu einer korrekten Schützung der 2'- und 3'-Hydroxygruppen mit *p*-Methoxybenzaldehyd gekommen ist. Die Anwesenheit des Stereozentrums **A** und das Fehlen der 2'- und 3'-Hydroxyprotonen zeigen jedoch, dass die Hydroxygruppen trotzdem mit einem Reaktionspartner reagiert haben. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Reaktion letztlich abgelaufen ist. Zusätzliche Protonen sind als zwei Methylgruppen bei 1,4 ppm, sowie zwei Methylenprotonen im Bereich zwischen 3,5 und 4 ppm erkennbar. Diese drei Gruppen, die auch schon im ¹³C-Spektrum sichtbar waren, lassen sich keiner Struktur des Moleküls zuordnen und es ist nicht genau feststellbar, ob diese Signale zum Molekül oder einer etwaigen Verunreinigung (z. B. Ethylacetat) gehören.

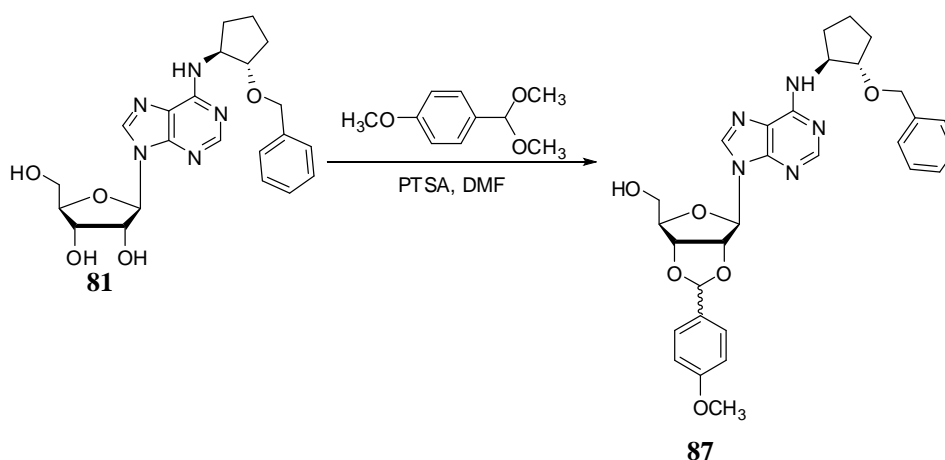


Abbildung 3.51: Vorschrift zur Darstellung von 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-N⁶-(2-hydroxy)cyclopentyladenosin (**87**) nach Riley.²⁰¹

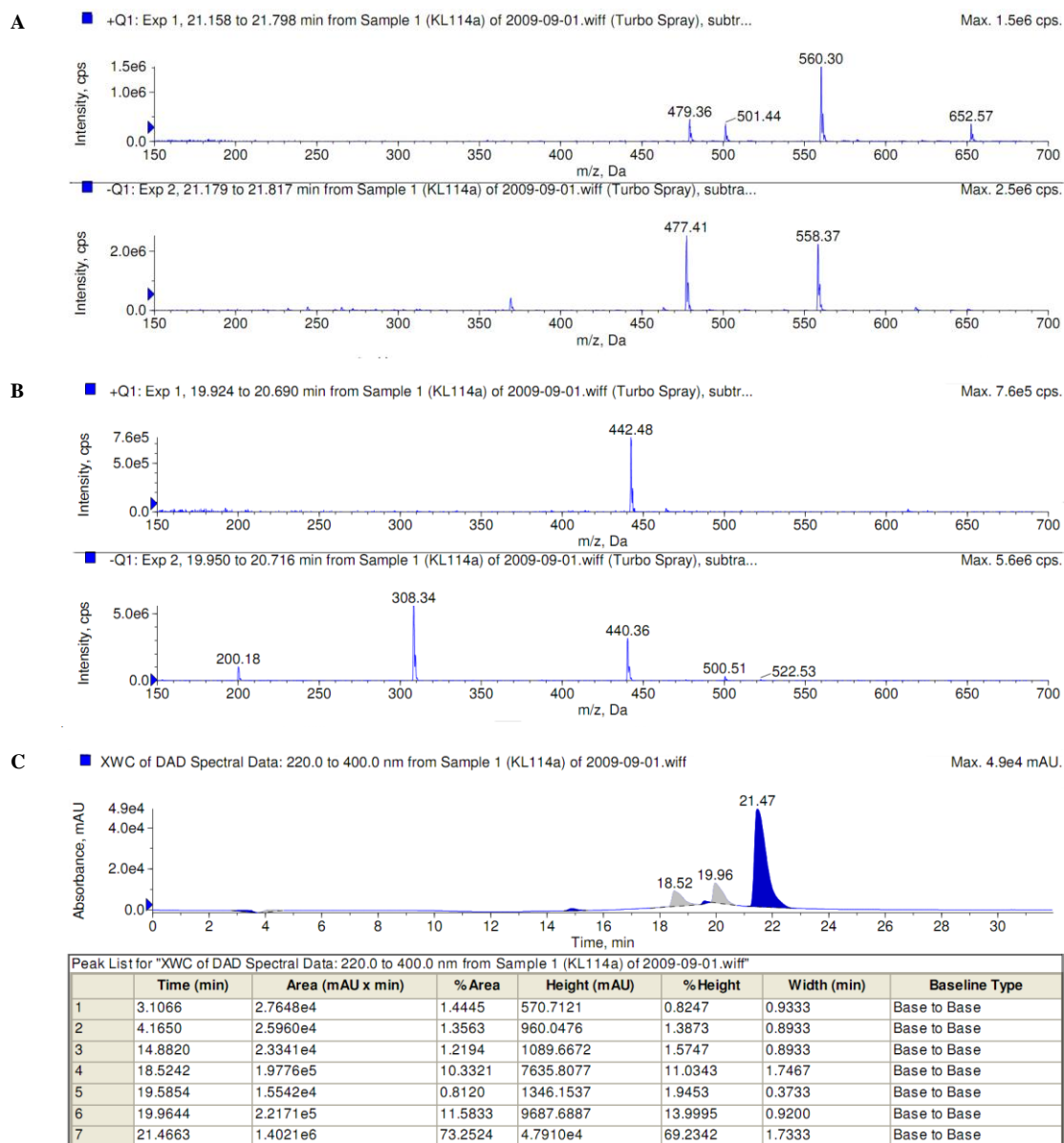


Abbildung 3.52: LC/ESI-MS-Spektrum der Synthese von Verbindung **87** nach Riley.

Verbindung **81** wurde deshalb erneut nach der bereits vorher beschriebenen Methode nach Riley et al. umgesetzt.²⁰¹ Für diese Synthese wurde als Reagenz statt Anisaldehyd wieder das Dimethylacetal des Anisaldehyds verwendet. Ein LCMS-Spektrum bestätigte die Identität der gewünschten Verbindung (Abbildung 3.52a). Zusätzlich konnte auch das Edukt (**81**) in der Reaktionsmischung identifiziert werden. Die Aufreinigung des Produktes erwies sich, wie die des Chlor-Derivates (**85**), als schwierig. Die Reaktionsmischung wurde zunächst säulenchromatographisch mit Dichlormethan : Ethanol (95 : 5) als Eluent aufgereinigt. Eine Kristallisation der Verbindung aus verschiedenen Mischungen von Ethylacetat und Petrolether bzw. Diethylether blieb ebenfalls erfolglos. Es konnte schließlich nur eine Reinheit von etwa 74 % erreicht werden. Da sich die Verbindung nicht in einer Wasser : Methanol-Mischung lösen ließ und eine

Zugabe von Triethylamin zur besseren Löslichkeit bereits bei Verbindung **85** zu einer teilweisen Zersetzung der Verbindung geführt hatte, wurde hier auf eine Reinigung durch HPLC verzichtet. Das Produkt wurde also in dieser Reinheit zur anschließenden Mesylierung verwendet. Die Synthese des *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**88**) wurde unter Schutzgas-Atmosphäre durchgeführt.

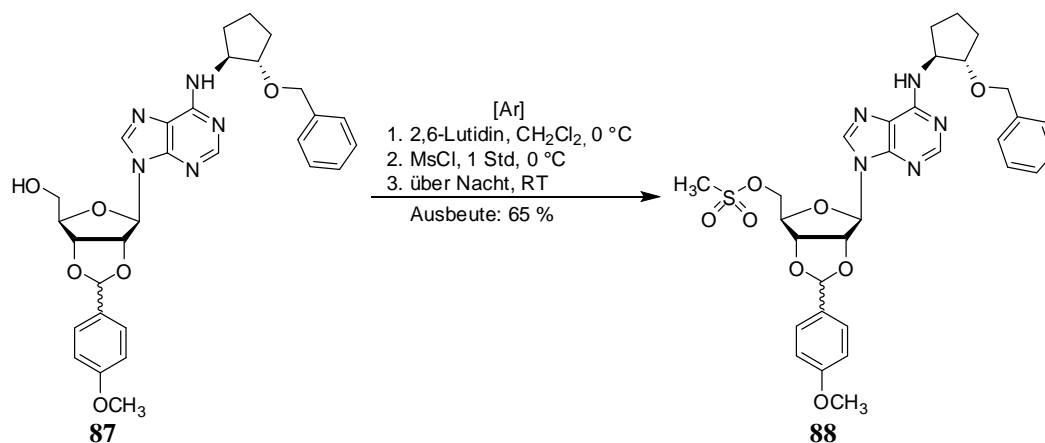


Abbildung 3.53: Darstellung von *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**88**).

Das 2',3'-geschützte Adenosin-Derivat wurde, wie bereits vorher beschrieben, bei 0 °C mit 2,6-Lutidin deprotoniert. Anschließend wurde Mesylchlorid langsam hinzugetropft und die Lösung eine Stunde bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Eisbad entfernt. Im Gegensatz zu den vorher dargestellten Mesyl-Verbindungen (**48** und **50**) war diese Reaktion bereits nach etwa 12 h beendet. Auch eine erneute Zugabe von Lutidin oder Mesylchlorid war hier nicht mehr notwendig. Man erhielt das Produkt (**88**) in einem *exo*- : *endo*-Diastereomeren-Verhältnis von etwa 1 : 1,2 in 65 %iger Ausbeute. Wie auch bei den Synthesen vorheriger Mesyl-Verbindungen wurde die Detektion des Produktes mittels Dünnschichtchromatographie sowie die säulenchromatographische Aufarbeitung der Verbindung (Dichlormethan : Ethanol 93 : 7) durch die nur geringe Differenz der *R_f*-Werte zwischen Edukt und Produkt und durch das Vorhandensein von *exo*- und *endo*-Diastereomeren erschwert. Außerdem zeigte auch Verbindung **88** mangelnde Stabilität. Deshalb wurde erneut darauf geachtet, die Verbindung nicht zu erhitzen und möglichst schnell zu arbeiten. Das erhaltene Produkt wurde anschließend für die Fluorierung verwendet. Dazu wurde *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**88**) in einem Mikrowellengefäß in trockenem Dioxan gelöst. Es wurden Tetrabutylammonium-fluorid-Trihydrat (TBAF) und trockenes Pyridin zugegeben. Die Reaktion wurde in der Mikrowelle (15 bar, 130 °C, 150 W, 30 min) durchgeführt.²⁰⁴

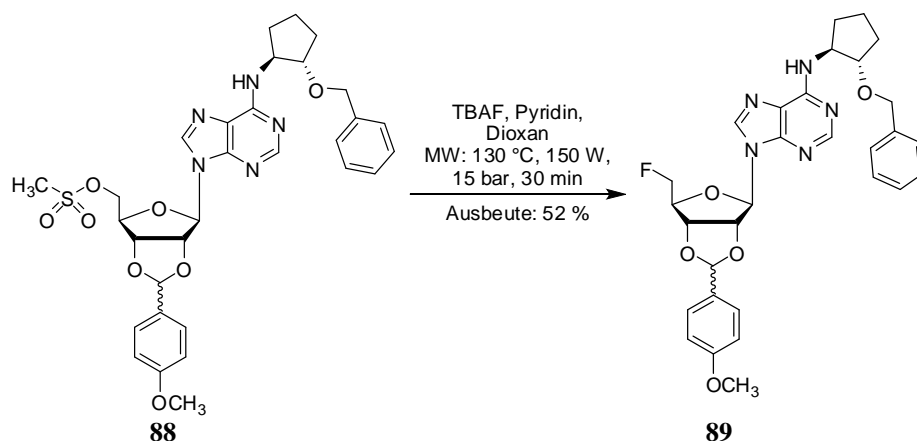


Abbildung 3.54: Darstellung von *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Benzyl oxy)cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (89).²⁰⁴

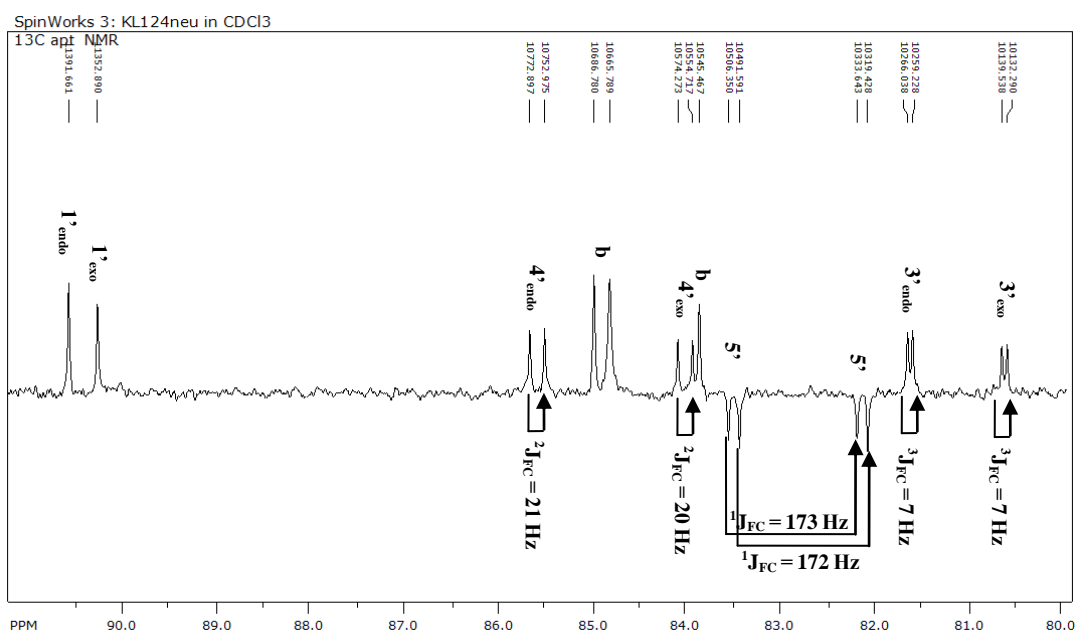
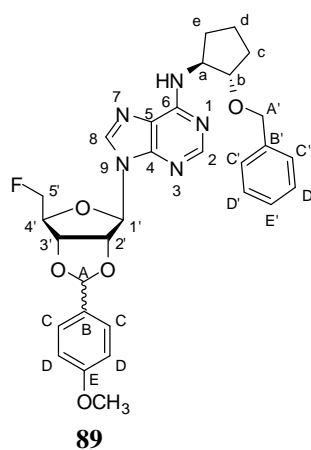


Abbildung 3.55: Ausschnitt aus dem APT-Spektrum von Verbindung 89.

Die Reaktion lieferte ein 1 : 1,2-Gemisch aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren in 52 %iger Ausbeute. Die erfolgreiche Fluorierung wurde im ¹³C-NMR-Spektrum detektiert. Durch die Substitution mit Fluor in 5'-Position kommt es im Bereich der Kohlenstoffatome der Ribose durch die Fluor-Kohlenstoff-Kopplung zu einer Aufspaltung der Signale. Anhand der Kopplungskonstanten konnten die Signale den einzelnen Kohlenstoff-Atomen zugeordnet werden (siehe Abbildung 3.55). Anschließend wurde die Benzyl-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung abgespalten. Dazu wurde Verbindung **89** in Methanol gelöst, mit Pearlman's Katalysator (Palladiumhydroxid auf Aktivkohle) versetzt und am Wasserstoffgenerator entschützt (siehe Abbildung 3.56).

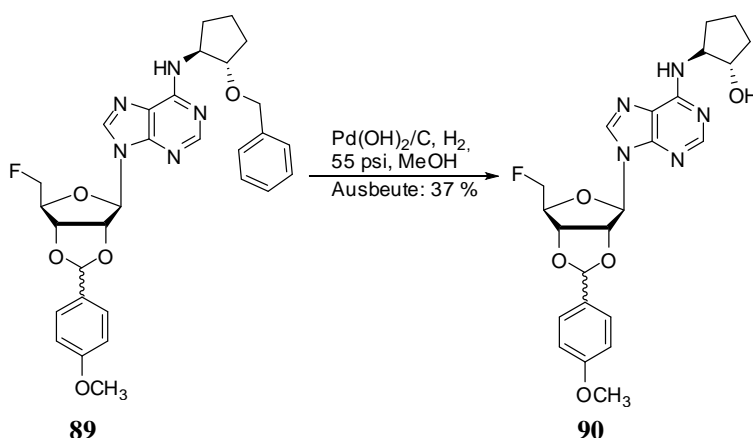


Abbildung 3.56: Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)-cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**90**).

Nachdem sich Verbindung **89** nach acht Tagen immer noch nicht vollständig umgesetzt hatte, wurde die Reaktion abgebrochen. Damit war die Reaktionsdauer sehr viel länger als die bei der Synthese von Verbindung **84**. Außerdem konnte das Produkt nur in einer Ausbeute von 37 % erhalten werden. Eine Erhöhung der Reaktionszeit oder eine Erwärmung der Reaktion auf mehr als 50 °C resultierte jedoch in einer teilweisen Zersetzung des bereits gebildeten Produktes. Zur Identifizierung dieses Zersetzungsproduktes wurden LC/ESI-MS-Spektren sowie ein- und zweidimensionale NMR-Spektren der Verbindung angefertigt. Das LC/ESI-MS-Spektrum zeigt als Hauptprodukt eine Verbindung mit der Molekülmasse 473 g/mol (siehe Abbildung 3.57a). Die Molekülmasse ist somit um 2 g/mol größer als erwartet. Im APT-Spektrum („Attached Proton Test“) erkennt man deutlich das Fehlen des Stereozentrums der *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe, welches zwischen 100 und 110 ppm erwartet würde (siehe Abbildung 3.58b). Die typische Aufteilung der Signale auf *endo*- und *exo*-Diastereomer ist ebenfalls nicht sichtbar. Allerdings konnten sowohl die aromatischen CH-Gruppen als auch die Methoxyfunktion der Schutzgruppe eindeutig detektiert werden. Ferner sieht man eine zusätzliche Methylen-Gruppe bei 72,97 ppm, die im zweidimensionalen HSQC-Spektrum an ein Signal im Bereich von 4,65 ppm koppelt (siehe Abbildung 3.59a). Im zweidimensionalen HMBC-Spektrum zeigt sich

die Fernkopplung dieser Methylengruppe zu den Protonen der aromatischen Kohlenstoffe der Schutzgruppe (siehe Abbildung 3.59b). Aus diesen gesammelten Daten wird deutlich, dass die Schutzgruppe sich partiell von der Ribose gelöst hat.

Um zu bestimmen, ob die Schutzgruppe sich von C-2' oder C-3' gelöst hat, wurden erneut die Fernkopplungen im HMBC-Spektrum betrachtet (siehe Abbildung 3.59b). Man erkennt eine ⁴J-Kopplung des C-3'-Protons zum C_{ipso} der Schutzgruppe. Damit ist die C-3'-Hydroxygruppe noch geschützt, die C-2'-Hydroxygruppe liegt hingegen frei vor (siehe Abbildung 3.58a).

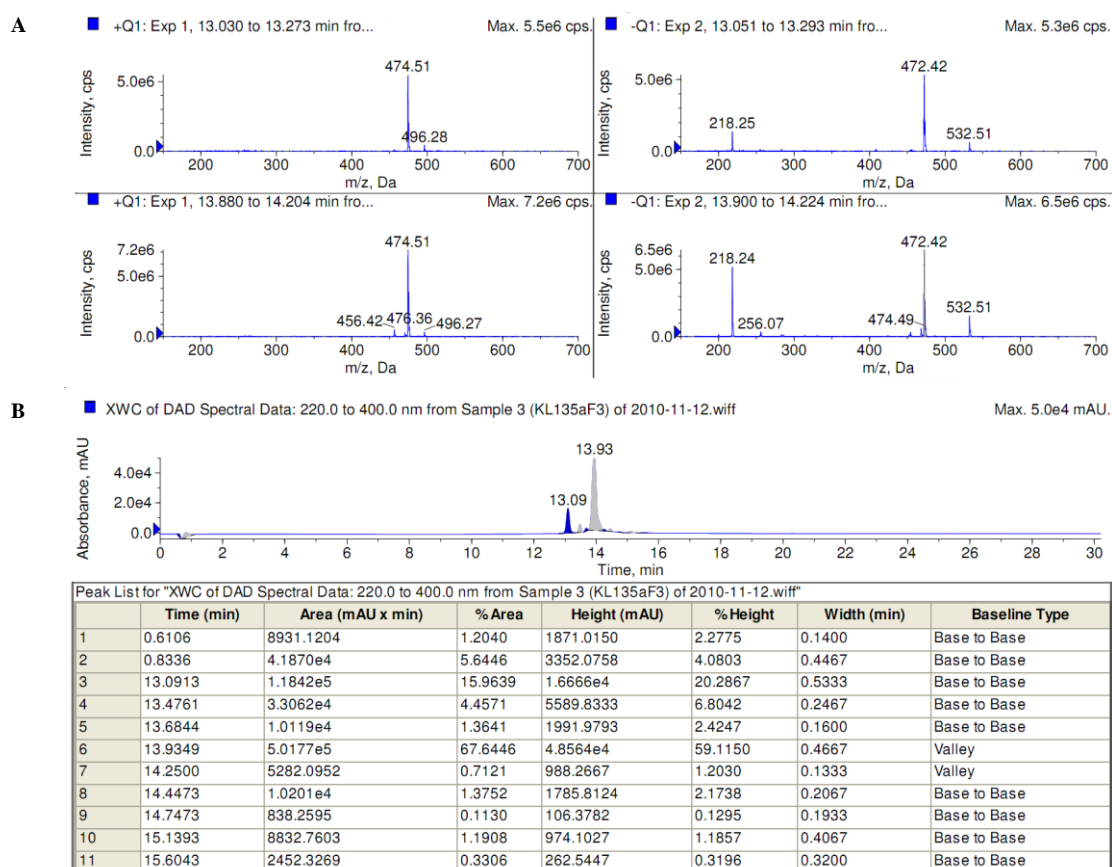
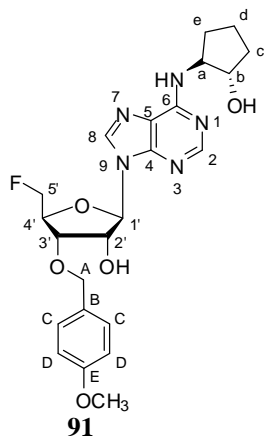
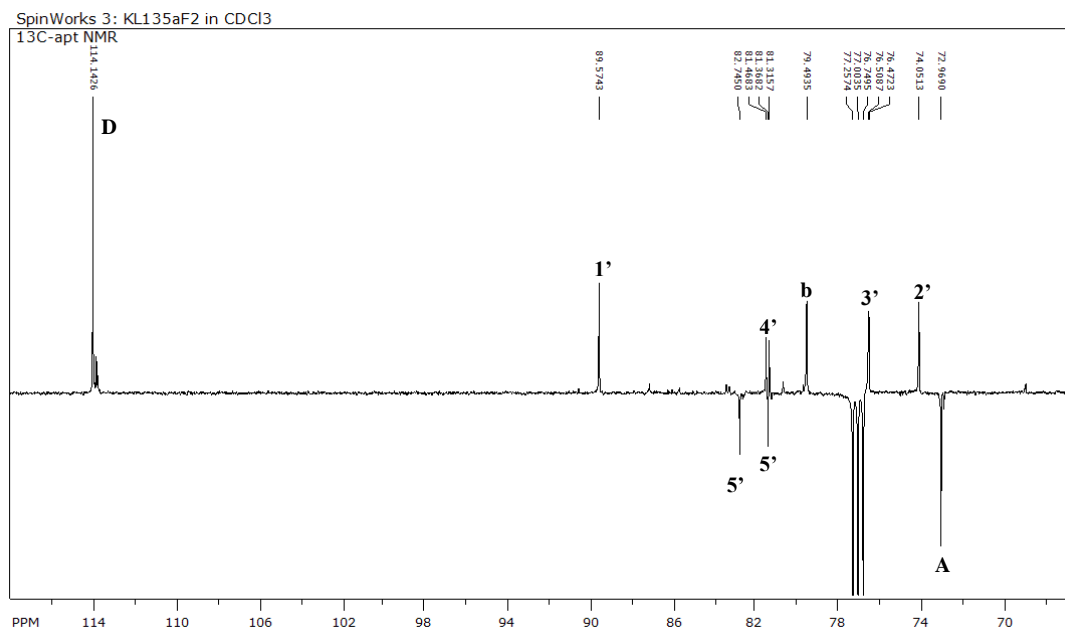


Abbildung 3.57: Das LC/ESI-MS-Spektrum zeigt als Hauptprodukt der katalytischen Hydrierung von 89 eine Verbindung mit der Molekülmasse 473 g/mol.



A



B

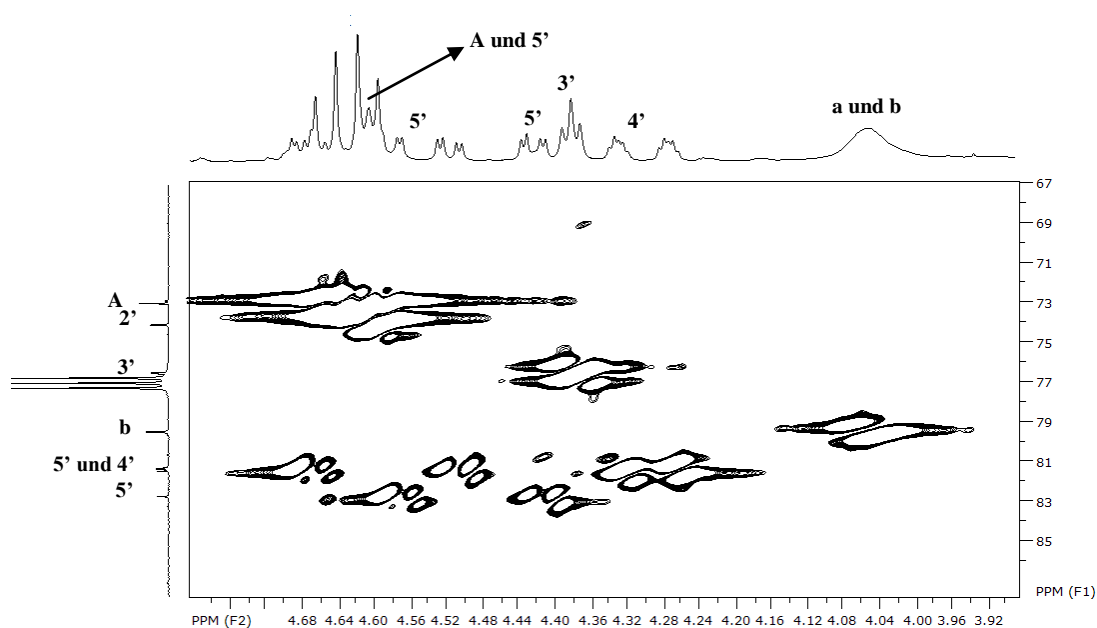


Abbildung 3.58: Ausschnitt aus dem APT-Spektrum (A) und dem HSQC-Spektrum (B) der Verbindung 91.

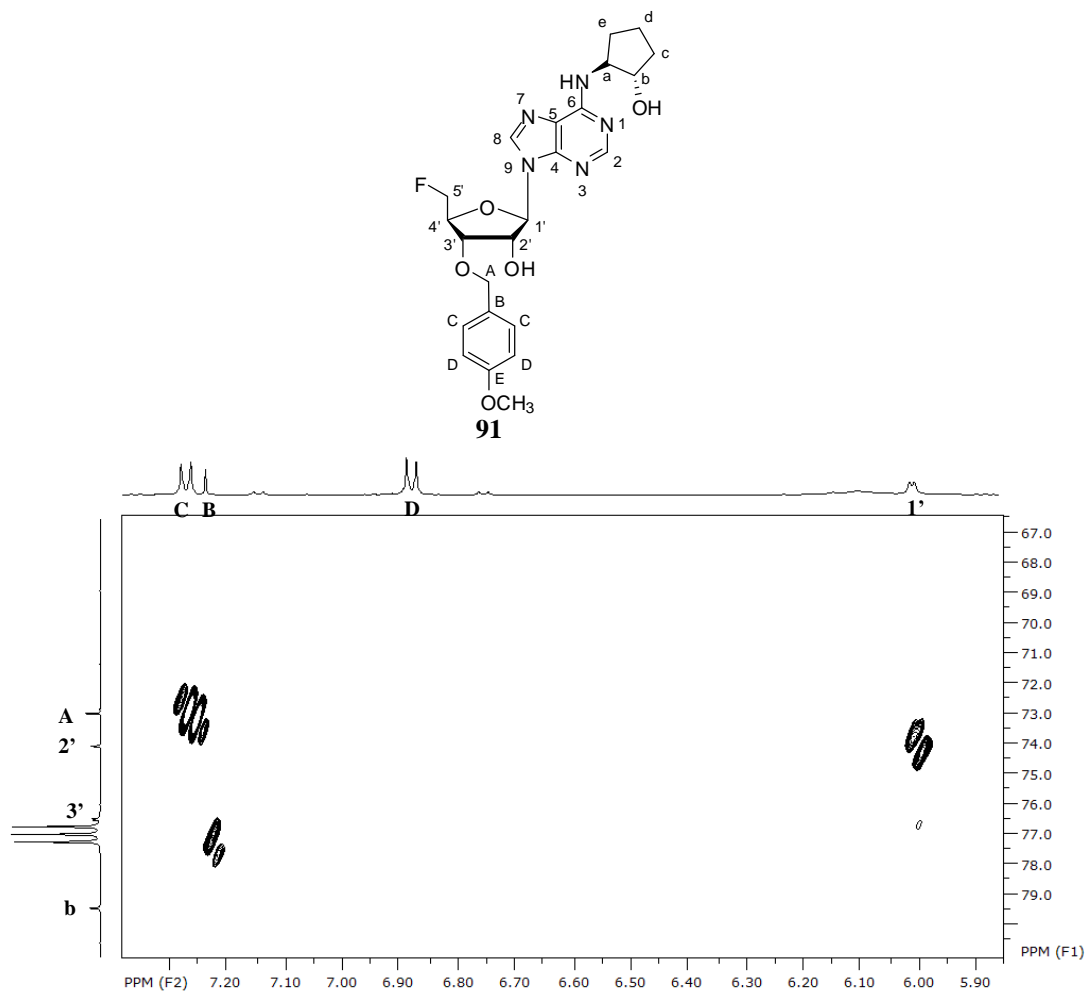


Abbildung 3.59: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der Verbindung **91**.

Verbindung **91** konnte schließlich zur Synthese von 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)-cyclopentyladenosin (**92**) verwendet werden (siehe Abbildung 3.60), welches ebenfalls als A₁-Agonist Anwendung findet.²²⁶

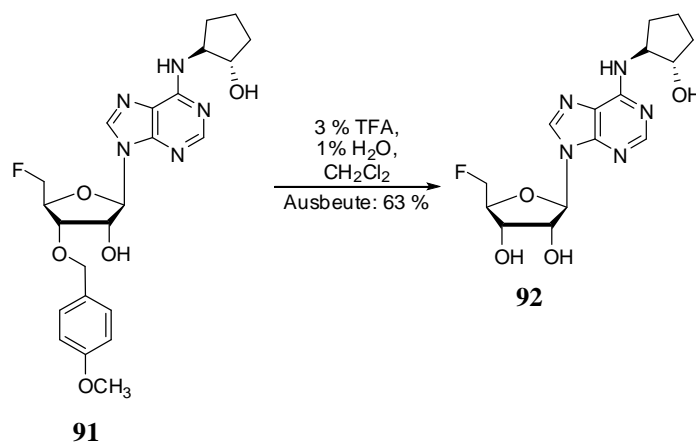


Abbildung 3.60: Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)-cyclopentyladenosin **92**.

Die geschützte Verbindung **90** wurde anschließend nach der vorher schon beschriebenen Methode mit 2,6-Lutidin deprotoniert und mit Tosylchlorid umgesetzt. Es wurde erneut versucht, möglichst schnell und ohne Wärmezufuhr zu arbeiten.

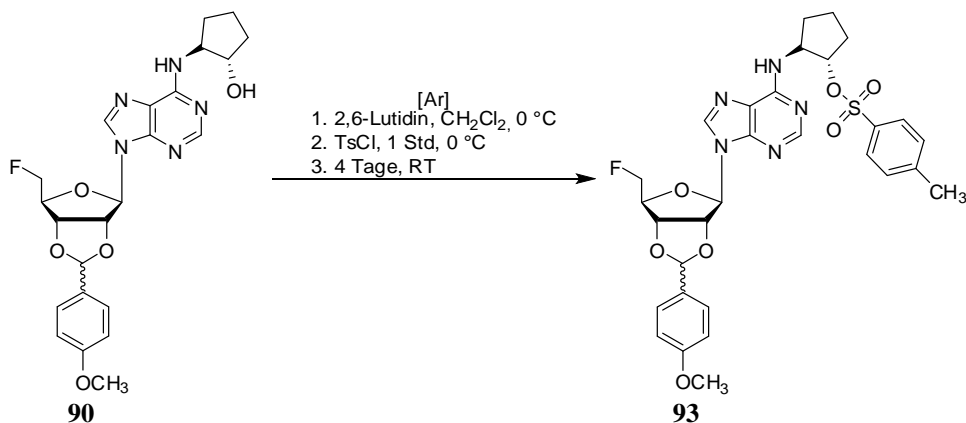


Abbildung 3.61: Synthesbedingungen zur Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-2',3'-O-p-methoxybenzyliden-N⁶-((1S,2S)-2-tosyl)cyclopentyladenosin (93**).**

Die Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittelgemischen aus Dichlormethan und Ethanol in den Verhältnissen 98 : 2, 95 : 5, 93 : 7 und 90 : 10 sowie in Ethylacetat : Petrolether in einem Verhältnis von 80 : 20 beobachtet. Da auch nach vier Tagen keine Veränderung der Reaktionsmischung festgestellt werden konnte, wurde die Reaktion abgebrochen und die Reaktionsmischung durch LC/ESI-MS-Analyse analysiert. In der getesteten Probe konnten sowohl das Edukt **90** mit einer Molekülmasse von 471 g/mol (siehe Abbildung 3.62A) als auch das Produkt **93** mit einer Molekülmasse von 625 g/mol (siehe Abbildung 3.62B) detektiert werden. Beide Verbindungen besitzen jedoch scheinbar nicht nur den gleichen R_f-Wert in den getesteten Lösungsmittel-Gemischen, sondern sind sich so ähnlich, dass sie durch die LC-Einheit des Gerätes nicht getrennt werden konnten (siehe Abbildung 3.62A und B). Ferner kann man bereits eine beginnende Zersetzung des Tosylates erkennen. Das Eliminationsprodukt besitzt eine Molekülmasse von 453 g/mol (siehe Abbildung 3.62C). Im Folgenden wurden die Verhältnisse dieser drei Verbindungen zueinander vor und nach der säulenchromatographischen Aufreinigung betrachtet, um die Stabilität des Tosylates abschätzen zu können. Das Verhältnis von Edukt zu Produkt wird sichtbar, wenn man die beiden jeweiligen Molekülmassen im XIC („Extracted Ion chromatogram“) anzeigen lässt (siehe Abbildung 3.63A).

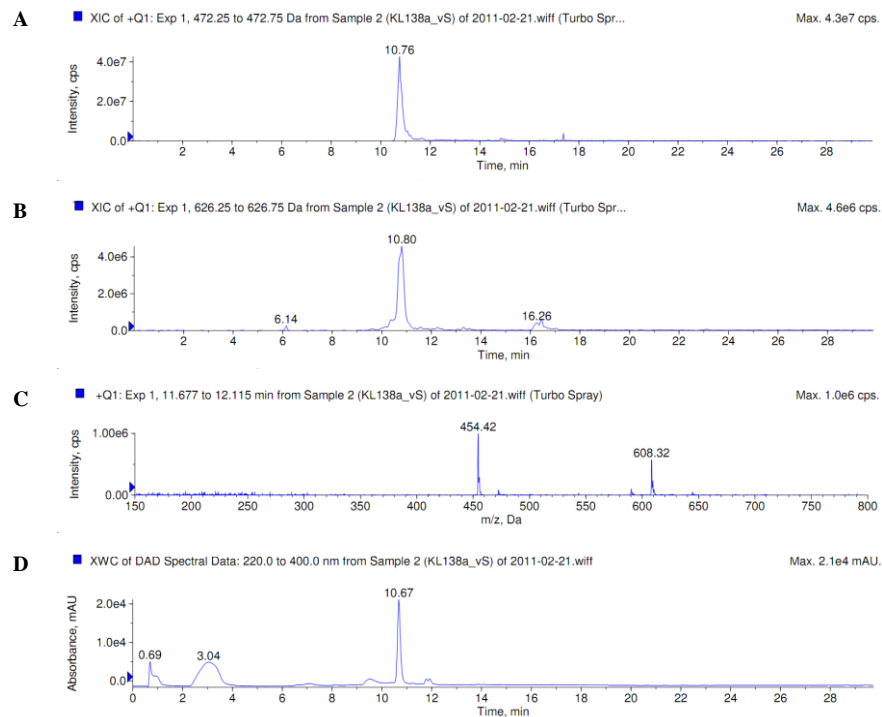


Abbildung 3.62: LC/ESI-MS-Spektrum der Reaktionsmischung der Synthese von Verbindung 93.

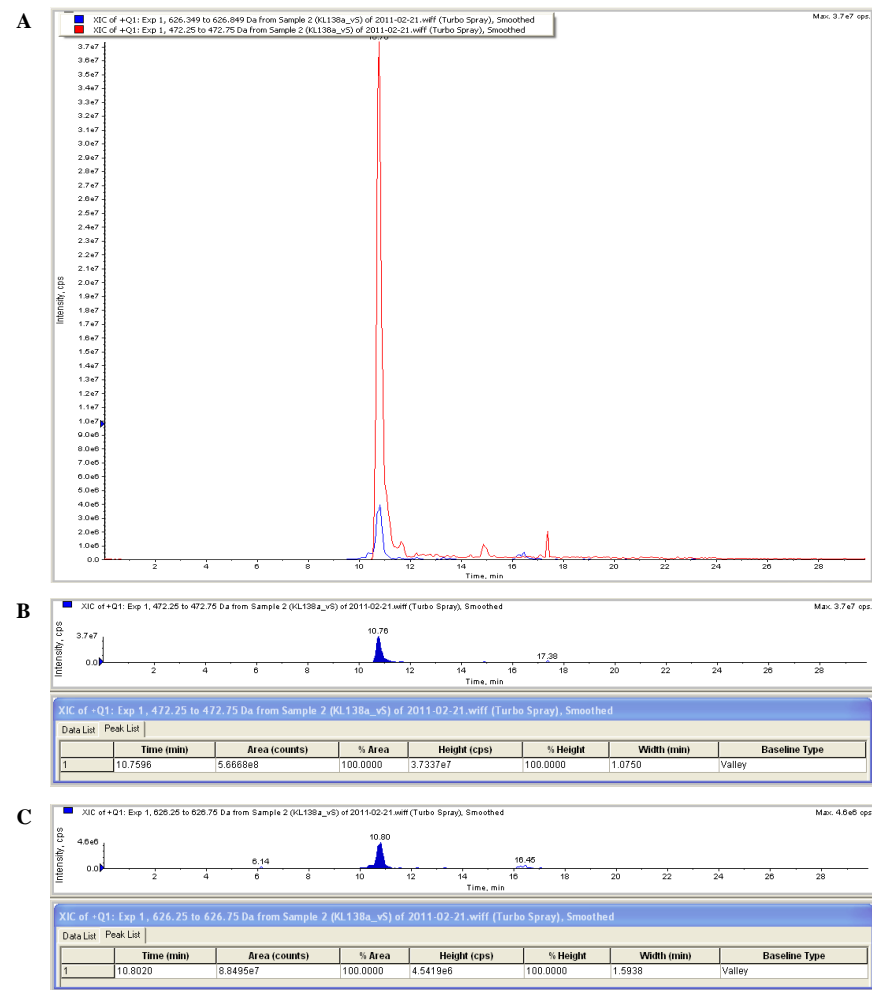


Abbildung 3.63: LC/ESI-MS-Spektrum der Reaktionsmischung der Synthese von Verbindung 93. A) Übereinanderlagerung der „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Eduktes 90 (rot) und des Produktes 93 (blau); B) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Eduktes 90 mit Integration des Peaks; C) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Produktes 93 mit Integration des Peaks.

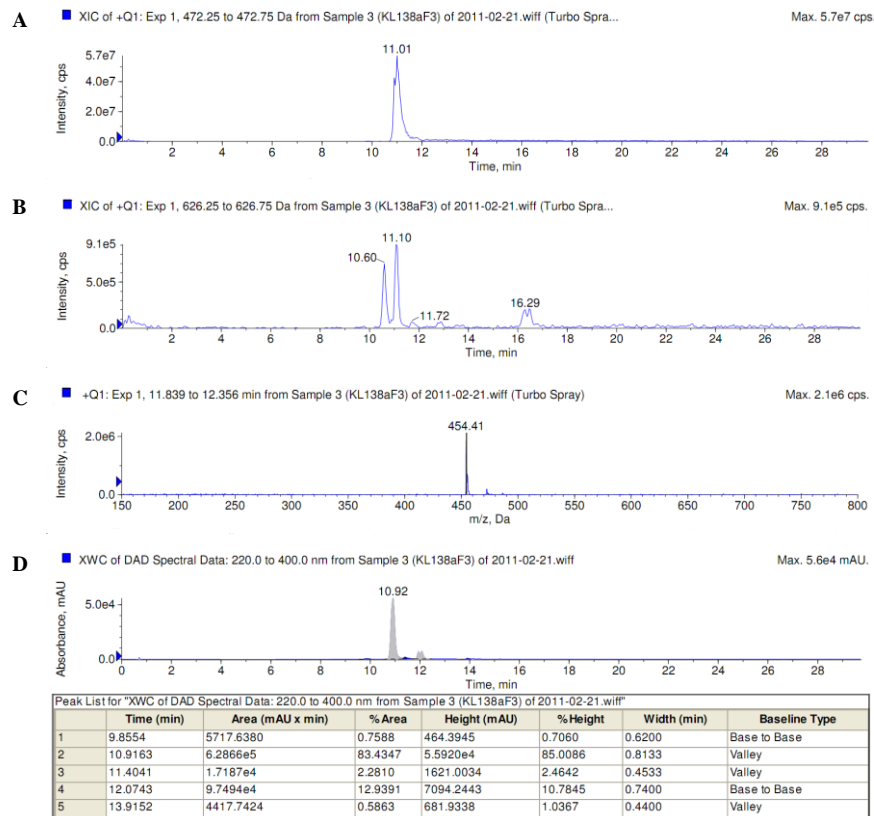


Abbildung 3.64: LC/ESI-MS-Spektrum der Produktfraktion nach säulen-chromatographischer Aufreinigung von Verbindung 93.

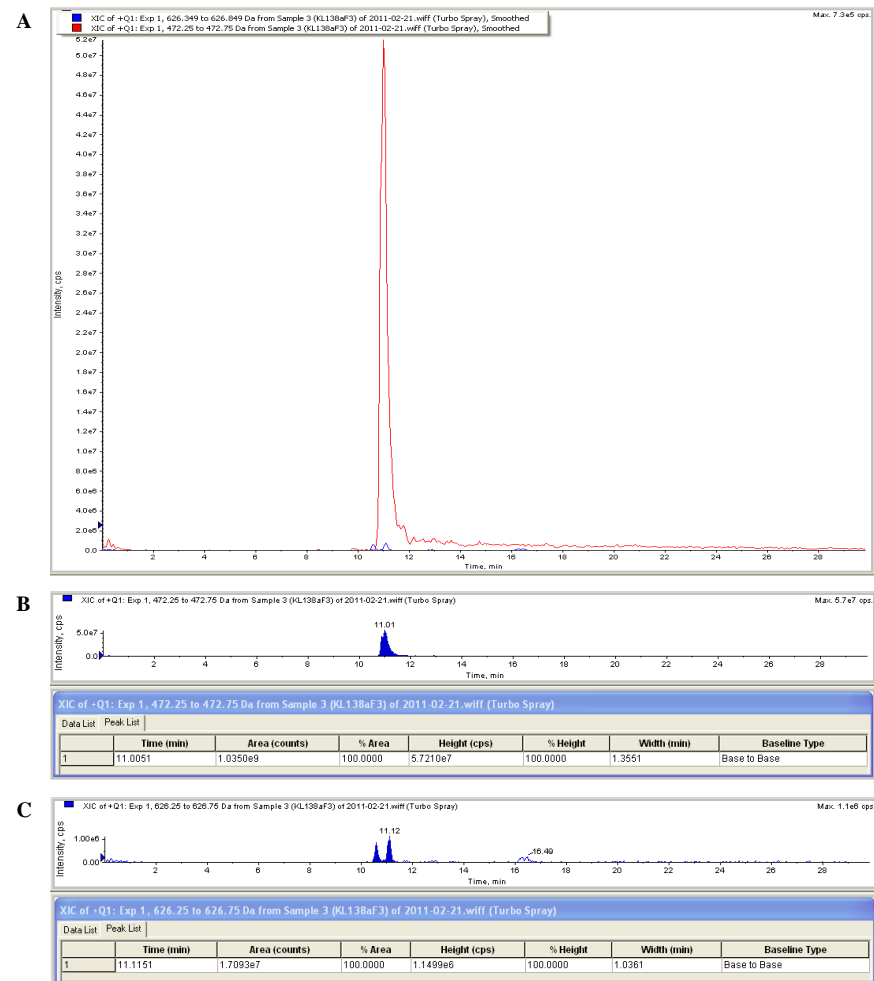


Abbildung 3.65: LC/ESI-MS-Spektrum der Produktfraktion nach säulen-chromatographischer Aufreinigung von Verbindung 93. A) Übereinander-lagerung der „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Eduktes 90 (rot) und des Produktes 93 (blau); B) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Eduktes 90 mit Integration des Peaks; C) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Produktes 93 mit Integration des Peaks.

Durch Integration der jeweiligen Peaks (siehe Abbildung 3.63B und C) kann man ein theoretisches Verhältnis zwischen Edukt und Produkt (Tosylat) berechnen. Dieses Verhältnis repräsentiert nicht die tatsächliche Molekülanzahl in der Probe, sondern die Intensität der auf den Detektor getroffenen Ionen. Diese ist stark von verschiedenen Substanz-spezifischen Eigenschaften (z. B. der Ionisierbarkeit) abhängig. Diese Eigenschaften sind jedoch für die jeweiligen Verbindungen unveränderlich. Die Verhältnisse vor und nach der Aufreinigung sind somit bedingt vergleichbar. Das berechnete Verhältnis zwischen Edukt und Produkt betrug vor der Aufreinigung etwa 6 : 1 zugunsten des Eduktes. Die Reaktionsmischung wurde anschließend säulenchromatographisch mit Petrolether : Ethylacetat (20 : 80) als Eluent aufgetrennt. Nach der massenspektrometrischen Analyse der Produktfraktion wurden wieder die Molekülmassen 471 g/mol, 625 g/mol und 453 g/mol detektiert (siehe Abbildung 3.64). Dadurch konnte einerseits bestätigt werden, dass die Hydroxyverbindung **90**, das Tosylat **93** und das Eliminierungsprodukt in den getesteten Lösungsmittelgemischen nicht unterscheidbare R_f-Werte aufweisen. Dass es sich bei der detektierten Molekülmasse 471 g/mol nicht um ein Fragment des Tosylates handelt, kann man dem ¹H-Spektrum der Verbindung entnehmen (siehe Abbildung 3.66).

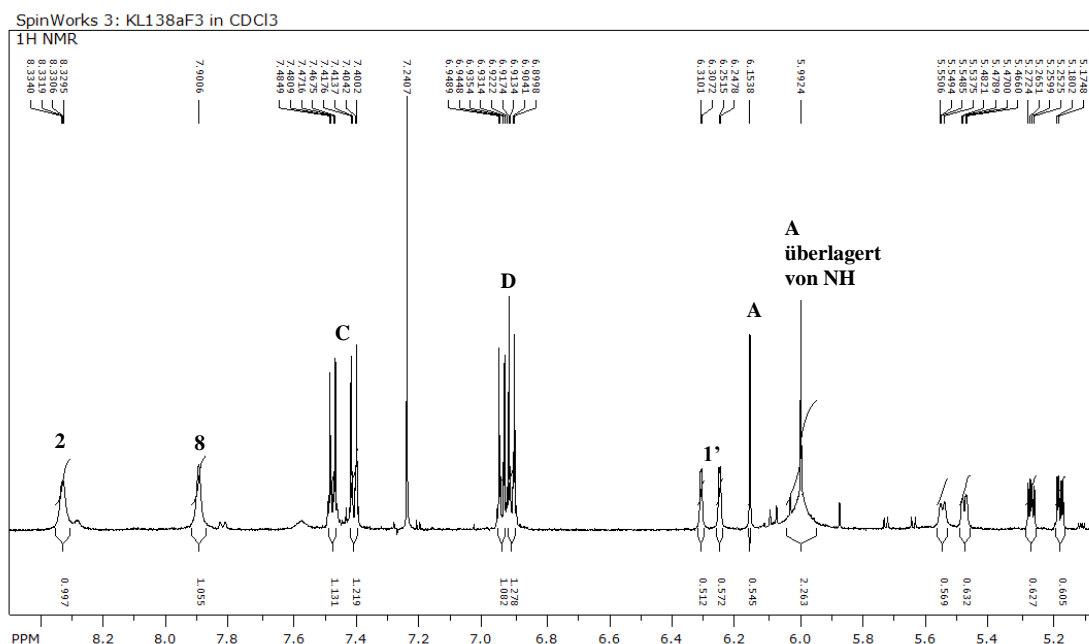


Abbildung 3.66: Ausschnitt aus dem ¹H-Spektrum der Produktfraktion der säulenchromatographischen Aufreinigung von Verbindung **93.**

Im Falle einer korrekten Bildung des Sulfonates müssten acht aromatische Protonen erkennbar sein, von denen je vier zu der *p*-Methoxybenzylidengruppe und vier zur Tosylgruppe gehören sollten. Stattdessen sind nur insgesamt vier Protonen detektierbar. Diese bilden zwei Sätze von Doppeldoublets mit einer ⁴J-Kopplungskonstante von 2,0 Hz und einer ³J-Kopplungskonstante

von 6,7 Hz zwischen den vicinalen Protonen. Die Aufspaltung der Signale in je zwei Doppel-doublets kommt durch den Einfluss des Stereozentrums der Schutzgruppe zustande. Damit handelt es sich bei der analysierten Verbindung eindeutig um **90**.

Andererseits konnten wieder die Integrale der Peaks der jeweiligen XIC-Spektren von Edukt (Molekülmasse 471 g/mol) sowie Tosylat (Molekülmasse 625 g/mol) zueinander ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 3.65) werden. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung betrug das Verhältnis von Edukt zu Produkt etwa 60 : 1 zugunsten des Eduktes. Es scheint also möglich, dass das Tosylat sich während der Aufreinigung zersetzt.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde anschließend das Verhältnis zwischen gebildetem Tosylat und Eliminierungsprodukt vor und nach der säulenchromatographischen Aufreinigung betrachtet.

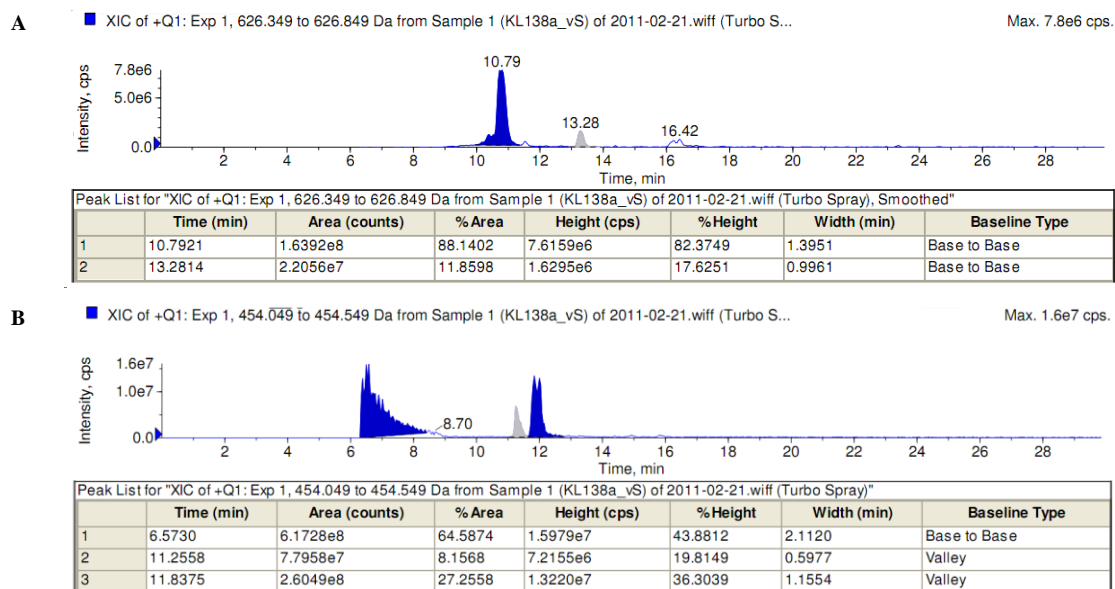


Abbildung 3.67: LC/ESI-MS-Spektrum der Reaktionsmischung der Synthese von Verbindung 93. A) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Tosylates 93 mit Integration der Peaks; B) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Eliminierungsproduktes mit Integration der Peaks.

Dazu wurden die beiden jeweiligen Molekülmassen, wie oben beschrieben, im XIC („*Extracted Ion chromatogram*“) dargestellt und die jeweiligen Peaks integriert. Das LCMS-Spektrum der Reaktionsmischung vor der säulenchromatographischen Aufreinigung ergab für die Molekülmasse des Tosylates (625 g/mol) ein verbreitertes Signal bei einer Retentionszeit von etwa 11 min sowie ein kleines Signal bei etwa 13 min (siehe Abbildung 3.67A). Für die Molekülmasse des Eliminierungsproduktes (453 g/mol) resultierte ein stark verbreitertes Signal bei etwa 7 min, ein scharfes Signal bei etwa 11 min sowie ein Doppelsignal bei etwa 12 min (siehe Abbildung 3.67B). Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung waren zwei scharfe

Signale für die Molekülmasse des Tosylates bei etwa 11 min erkennbar (siehe Abbildung 3.68A). Moleküle mit der Molekülmasse des Eliminierungsproduktes wurden bei einer Retentionszeit von etwa 11,5 min sowie bei etwa 12 min detektiert (siehe Abbildung 3.68B). Die Retentionszeiten dieser Verbindungen nach der säulenchromatographischen Aufreinigung stimmen gut mit denen der direkt vermessenen Reaktionsmischung überein. Die Signale bei 13 min in Abbildung 3.67A und bei 7 min in Abbildung 3.67B sind vermutlich Artefakte anderer Verbindungen, die zwar die richtige Molekülmasse besitzen, jedoch nicht das Tosylat (**93**) bzw. das Eliminierungsprodukt repräsentieren. Aus den detektierten und integrierten Signalen der Verbindungen vor sowie nach der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde nun das Verhältnis berechnet und miteinander verglichen. Vor der Aufreinigung betrug das Verhältnis zwischen dem Produkt der Reaktion (**93**) und dem Eliminierungsprodukt 1 : 2. Aus der Analyse der Produktfraktion der Säulenchromatographie resultierte ein Verhältnis zwischen Tosylat und Eliminierungsprodukt von 1 : 32.

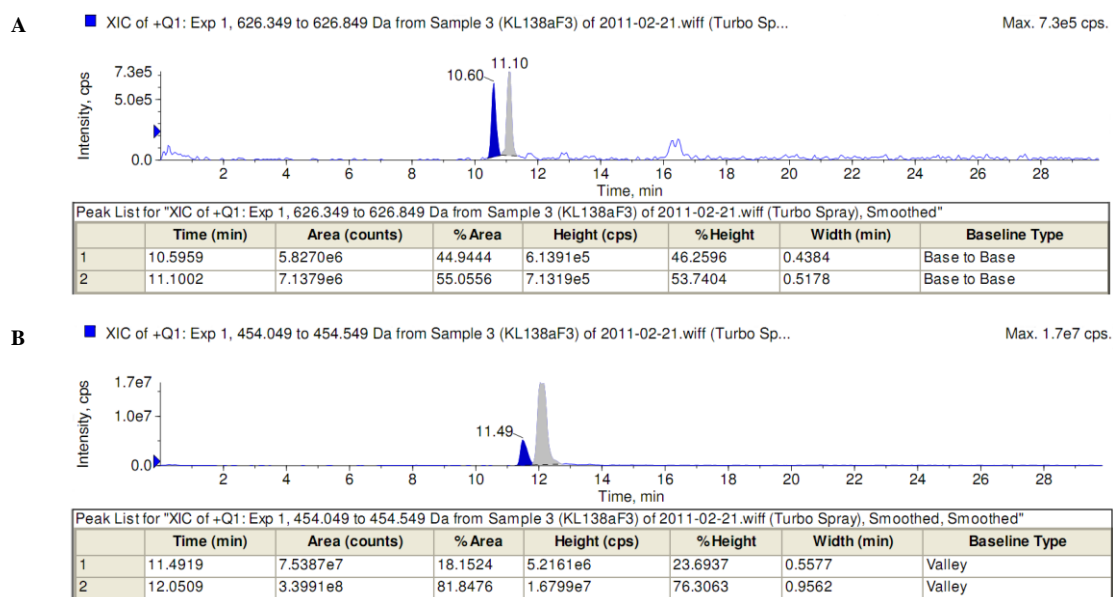


Abbildung 3.68: LC/ESI-MS-Spektrum der Produktfraktion der säulenchromatographischen Aufreinigung von Verbindung **93**. A) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Tosylates **93** mit Integration der Peaks; B) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Eliminierungsproduktes mit Integration der Peaks.

Obwohl die Absolutwerte dieser massenspektrometrischen Messung nicht die tatsächliche Molekülanzahl in der Probe, sondern die absolute Intensität der auf den Detektor getroffenen Ionen darstellt, zeigen die Ergebnisse deutlich eine signifikante Veränderung der Verhältnisse zwischen Edukt, Produkt und Eliminierungsprodukt. Bereits das Spektrum in Abbildung 3.62 machte deutlich, dass die Reaktion nur in einem sehr geringen Ausmaß abläuft. Ein Teil des Produktes wird bereits während der Reaktion wieder eliminiert. Während der säulenchromatogra-

phischen Aufreinigung kommt es dann schließlich zur nahezu vollständigen Eliminierung des Tosylates. Damit ist 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**93**) sogar sehr viel instabiler als das vorher synthetisierte *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**), welches nach der säulen-chromatographischen Aufreinigung weitestgehend intakt war und sich erst unter den Standard-fluorierungsbedingungen (erhitzen mit Kryptofix® 222 und Kaliumcarbonat in DMSO bzw. Acetonitril 10 min bei 70 - 90 °C) zersetzte. Folglich ist auch 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**93**) kein geeignetes Vorläufermolekül für die Positronen-Emissions-Tomographie.

Abschließend wurden schließlich Versuche unternommen, 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*R*)-2-fluor)cyclopentyladenosin durch gleichzeitige Fluorierung sowohl der 5'-Position als auch der *N*⁶-Cyclopentylfunktion herzustellen. Diese Verbindung ist bisher in der Literatur noch unbekannt und könnte als neuer A₁-Agonist Verwendung finden. Dazu wurde erneut von Verbindung **81** ausgegangen. Zunächst wurde die Benzylschutzgruppe nach vorher beschriebener Methode zur katalytischen Hydrierung abgespalten. Es resultierte GR79236 (**12**) in 74 %iger Ausbeute.

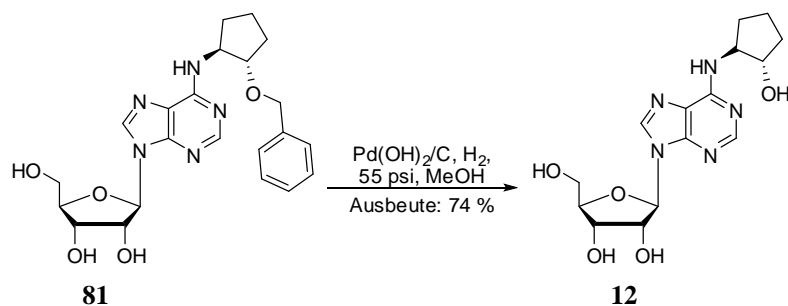


Abbildung 3.69: Darstellung von *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyladenosin (**12**).

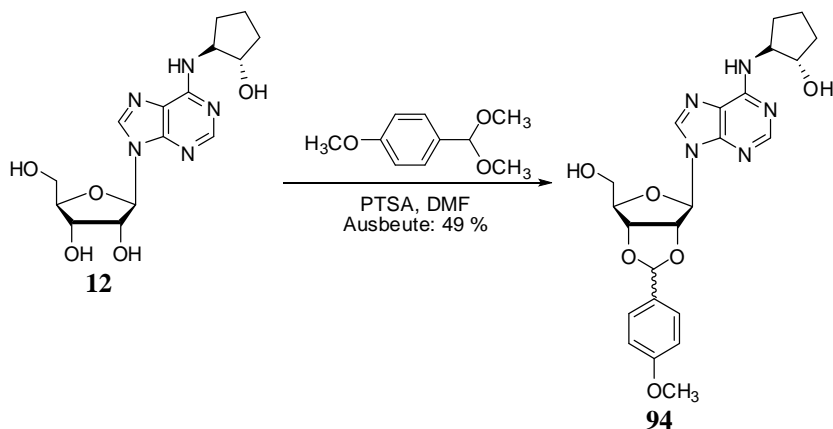


Abbildung 3.70: Darstellung von *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**94**).

Im folgenden Schritt wurde die *p*-Methoxybenzyliden-Gruppe zur Schützung der 2'- und 3'-Hydroxyfunktionen eingeführt. Dazu wurde Verbindung **12** nach Vorschrift von Riley et al. mit *p*-Methoxybenzaldehyd Dimethylacetal umgesetzt.²⁰¹ Die Identität der gewünschten Verbindung konnte durch LC/ESI-MS-Spektroskopie bewiesen werden.

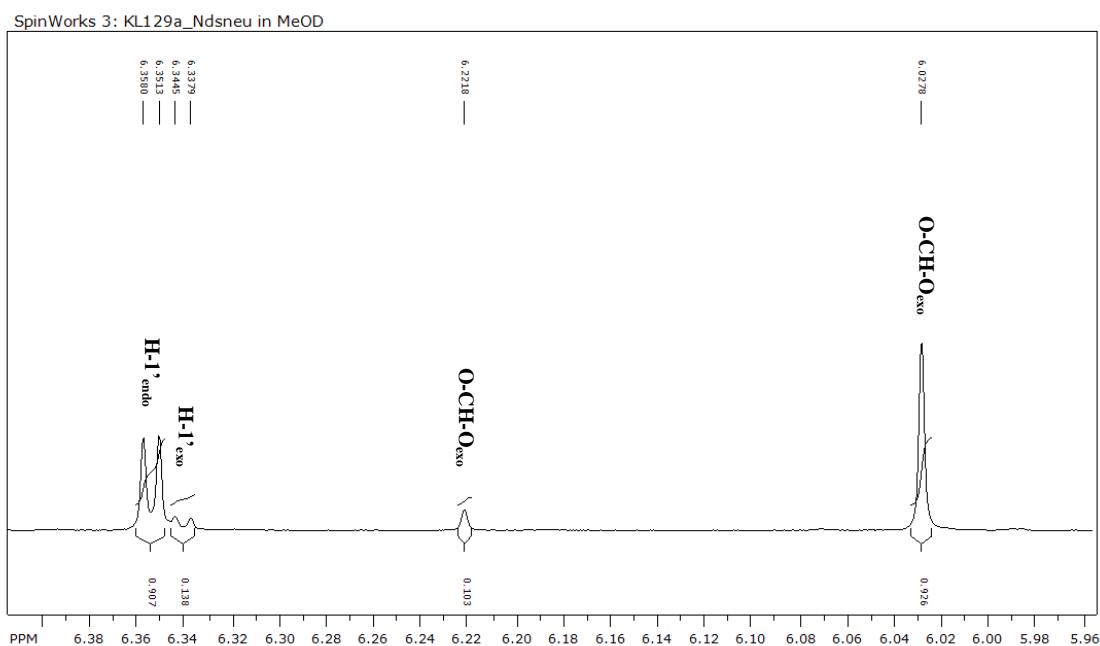
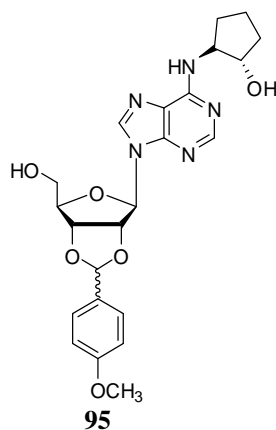


Abbildung 3.71: Ausschnitt aus dem ¹H-Spektrum von *N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**94**).

Jedoch erwies sich die Aufreinigung, wie auch bei früheren Schützungen mit *p*-Methoxybenzaldehyd, erneut als schwierig. Die Reaktionsmischung wurde zunächst säulenchromatographisch mit Dichlormethan : Ethanol (95 : 5) als Eluent gesäult. Trotz gut unterscheidbarer *R_f*-Werte der einzelnen Komponenten konnte aber keine ausreichende Trennung erreicht werden. Vermutlich löst sich das Produkt, wie auch schon für Verbindung **85** beobachtet, teilweise in dem Reagenz *p*-Methoxybenzaldehyd Dimethylacetal. Damit bilden sich zum Teil Mischfraktionen. Diese wurden vereint, zweimal mit je 50 ml Diethylether und einmal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert.

Beim Eindampfen der organischen Phasen fiel ein Niederschlag aus, der abfiltriert und getrocknet wurde. Der Überstand wurde erneut säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan : Ethanol; 85 : 15). Die wässrige Phase wurde erneut mit 50 ml *n*-Heptan extrahiert. Diese zweite organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Das vereinte Produkt wurde im Vakuum getrocknet und konnte in einer Ausbeute von 49 % als *exo*- und *endo*-Diastereomeren-Gemisch in einem Verhältnis von 1 : 9 gewonnen werden. Anschließend wurden 100 mg des erhaltenen Produktes (**94**) nach der oben beschriebenen Methode zur Synthese von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**) mit 2,6-Lutidin deprotoniert und mit Tosylchlorid umgesetzt. Es wurde erneut versucht, möglichst schnell und ohne Wärmezufuhr zu arbeiten.

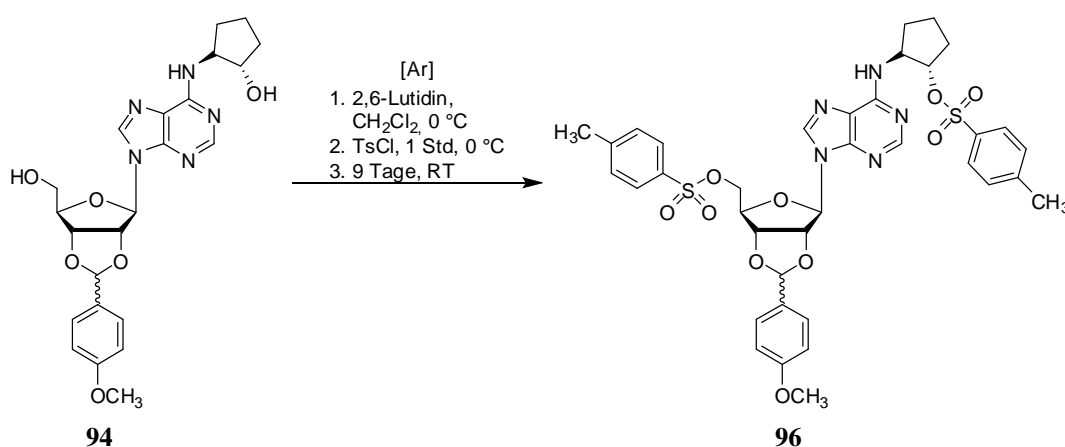


Abbildung 3.72: Synthesebedingungen zur Darstellung von 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-5'-Tosyl-*N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyladenosin (**96**).

Die Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie in Dichlormethan : Ethanol (98 : 2) verfolgt. Da auch nach neun Tagen und erneuter Zugabe von Lutidin und Tosylchlorid keine Vollständigkeit der Reaktion erzielt werden konnte, wurde die Reaktion abgebrochen und die Reaktionsmischung säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol, 98 : 2) aufgereinigt. Es wurden insgesamt fünf Fraktionen voneinander getrennt. Die unpolarste Fraktion bestand aus Toluensulfonylchlorid. Die polarste Fraktion war mit einer erhaltenen Masse von 44 mg die größte Fraktion und wurde als Edukt (**94**) identifiziert. Die drei verbliebenen Fraktionen zeigten sehr ähnliche *R_F*-Werte. Fraktion 3 bestand aus der Base 2,6-Lutidin. Die Fraktionen 2 und 4 wurden schließlich durch LC/ESI-MS-Analyse identifiziert. In beiden getesteten Proben konnten sowohl das ditosylierte Produkt (**96**) mit einer Molekülmasse von 777 g/mol (siehe Abbildung 3.73A) als auch das monotosylierte Produkt (**97**) mit einer Molekülmasse von 623 g/mol (siehe Abbildung 3.73B) detektiert werden (siehe Abbildung 3.74). Wieder scheinen sich die *R_F*-Werte der beiden Verbindungen sowohl in unpolaren als auch in polaren Lösungsmittelgemischen nicht zu unterscheiden.

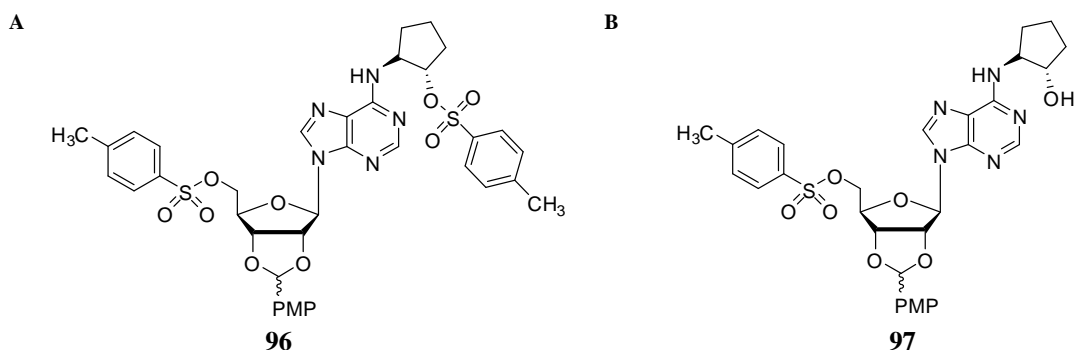


Abbildung 3.73: Strukturformeln von 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-5'-Tosyl-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyladenosin (96) sowie 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-5'-tosyl-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyladenosin (97); PMP = *p*-Methoxyphenyl.

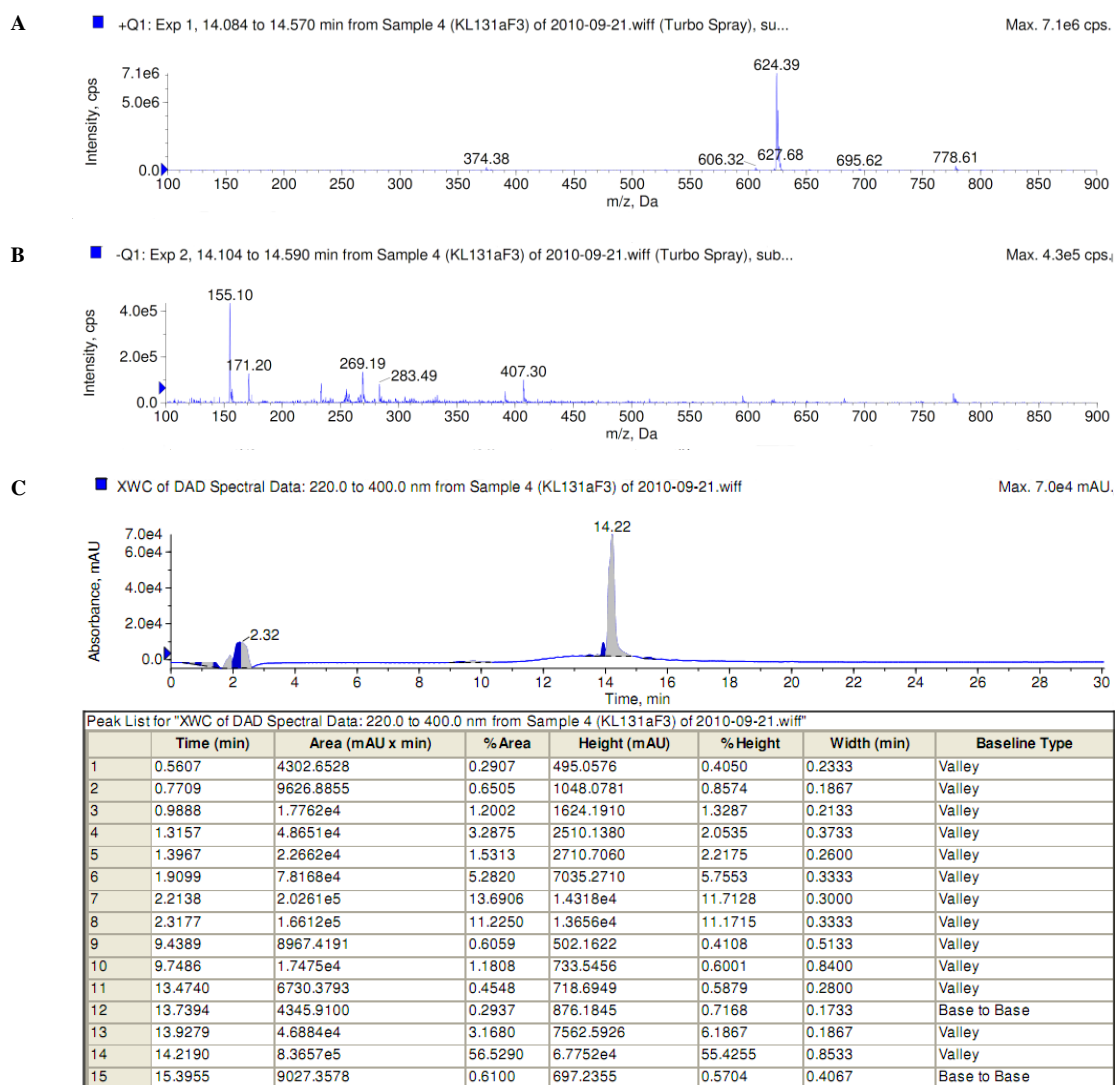


Abbildung 3.74: LC/ESI-MS-Spektrum von Fraktion 3 der säulenchromatographischen Aufreinigung von Verbindung 96. A) Positive Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 13,963 und 14,529 min; B) Negative Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 13,9983 und 14,549 min; C) UV-Absorption (254 nm).

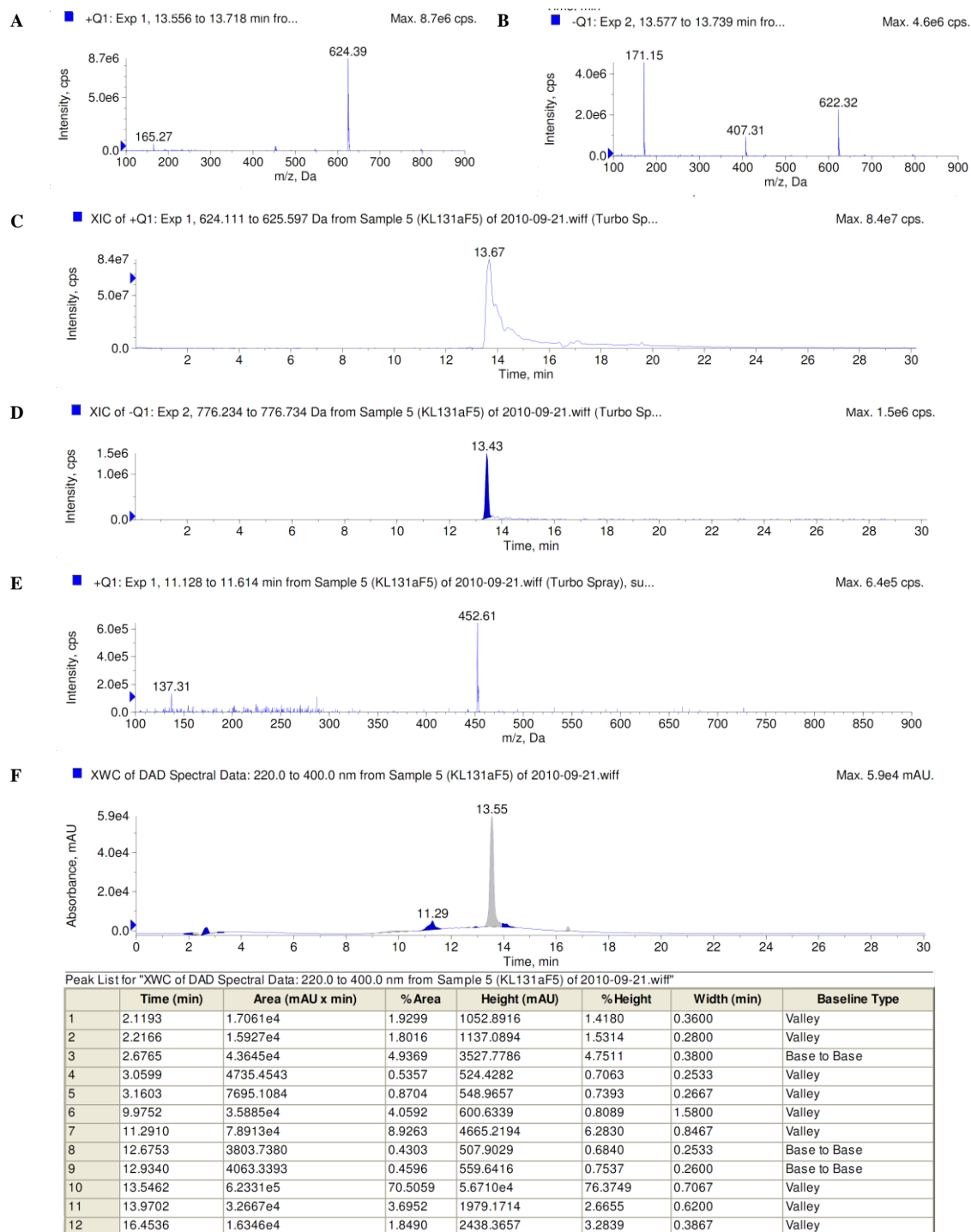


Abbildung 3.75: LC/ESI-MS-Spektrum von Fraktion 4 der säulenchromatographischen Aufreinigung von Verbindung 96. A) Positive Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 13,354 und 13,921 min; B) Negative Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 13,374 und 14,941 min; C) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Monotosylates 97; D) „Extracted Ion chromatogram“ (XIC) des Ditosylates 96; E) Positive Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 11,250 und 11,816 min; F) UV-Absorption(254 nm).

Ferner kann man bei Fraktion 4 bereits eine beginnende Zersetzung des Monotosylates erkennen. Das entstehende Eliminierungsprodukt besitzt eine Molekülmasse von 451 g/mol (siehe Abbildung 3.75E).

Fraktion 5, die eine bessere Reinheit aufwies als Fraktion 3, wurde anschließend unter den oben beschriebenen Bedingungen nach Le et al. in der Mikrowelle fluoriert.²⁰⁴

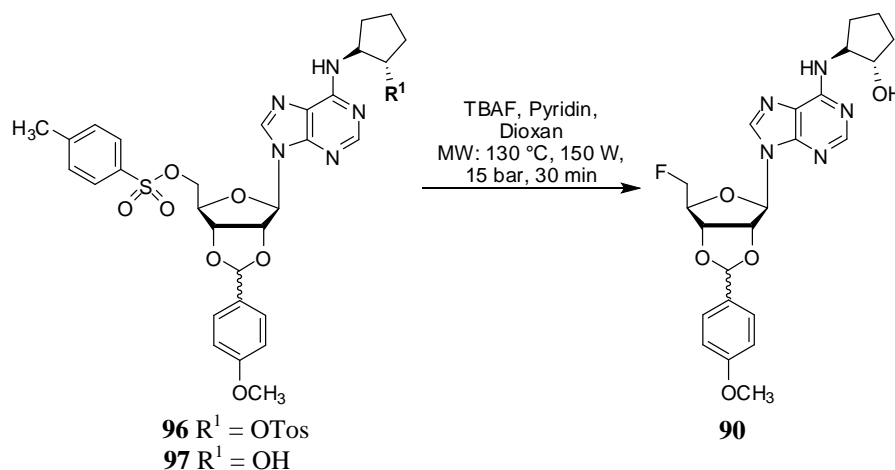


Abbildung 3.76: Die Fluorierung der Mischung aus 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-5'-tosyl-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyladenosin (**96**) und 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-5'-tosyladenosin (**97**) unter Standardfluorierungsbedingungen führt ausschließlich zur Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**90**).

Obwohl in der eingesetzten Reaktionsmischung sowohl das Ditosylat als auch das Tosylat vorlagen, konnte nach der Fluorierung ausschließlich 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)-cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**90**) als Produkt in der Reaktionsmischung identifiziert werden (siehe Abbildung 3.77). Bereits frühere Experimente hatten ergeben, dass die Mesyl-Gruppe des Cyclopentylrestes nur eine sehr geringe Stabilität aufwies (siehe Abbildung 3.64). Dies bestätigt die vorher getroffene Annahme, dass 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**93**) und 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-5'-tosyl-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyladenosin (**96**) sogar sehr viel instabiler sind als das vorher synthetisierte *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**).

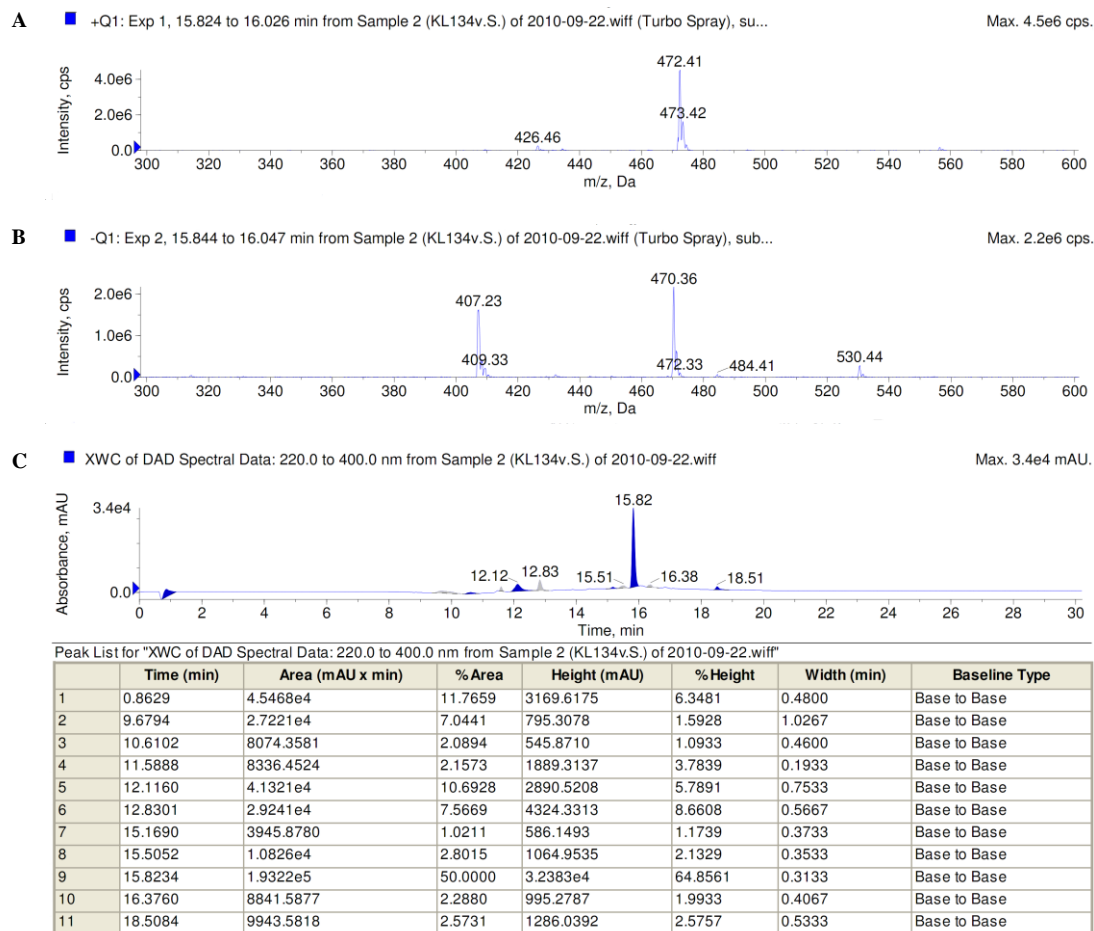


Abbildung 3.77: LC/ESI-MS-Spektrum der Reaktionsmischung der Fluorierungsreaktion. A) Positive Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 15,824 und 16,067 min; B) Negative Ionisierung der Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 15,844 und 16,087 min; C) UV-Absorption (254 nm).

Unter Umständen kann ein agonistischer PET-Ligand-Vorläufer auf Basis eines anderen A₁-Agonisten oder unter Verwendung einer anderen Abgangsgruppe realisiert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Moleküle sind aufgrund ihrer mangelnden Stabilität als Vorläufermolekül für die Positronen-Emissions-Tomographie jedoch ungeeignet.

Eine Zusammenfassung der oben beschriebenen Syntheseschritte zur Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (90) ist in Abbildung 3.78 und Abbildung 3.79 dargestellt.

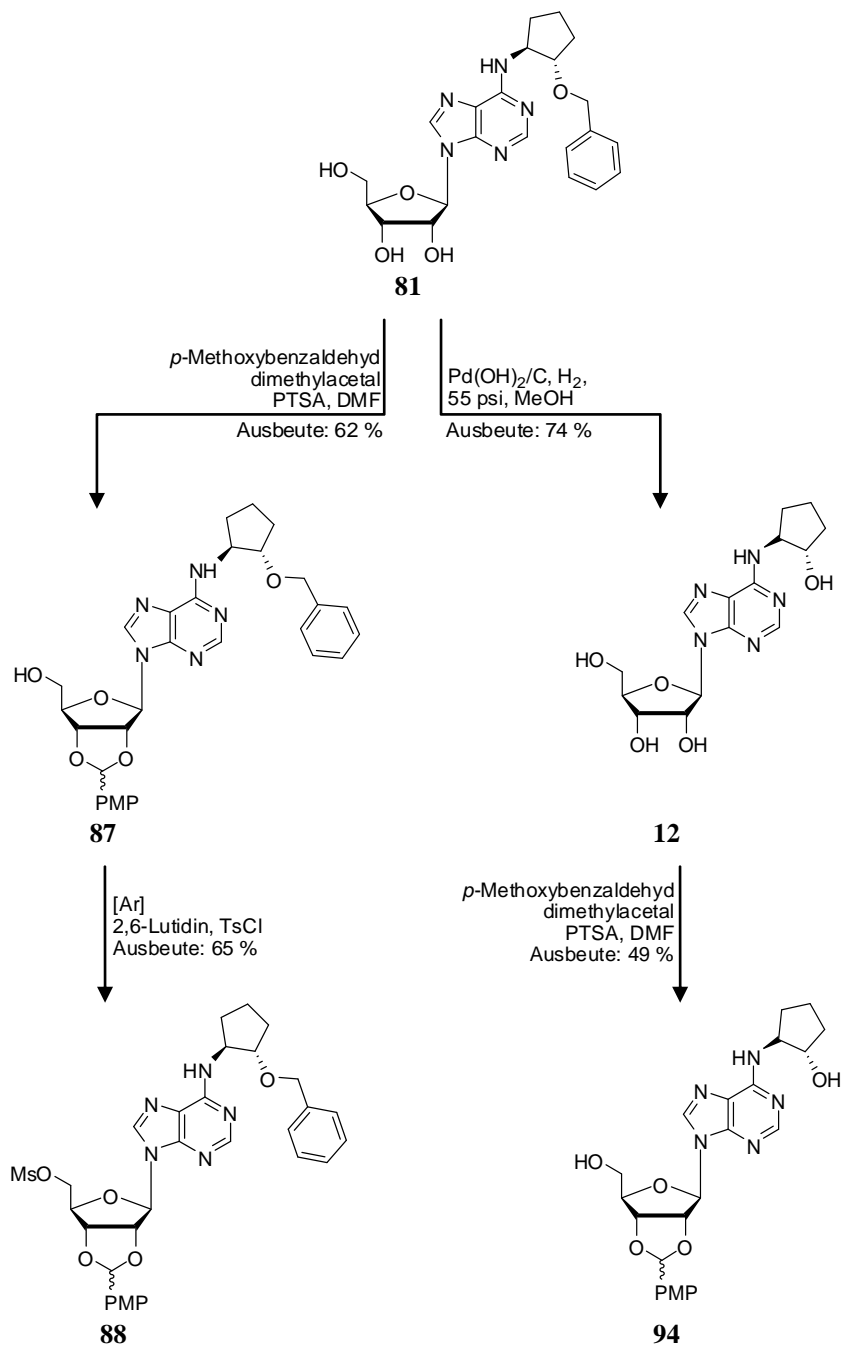


Abbildung 3.78: Zusammenfassung der Synthese von 5'-Desoxy-5'-fluor-N⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (90). – Teil 1.

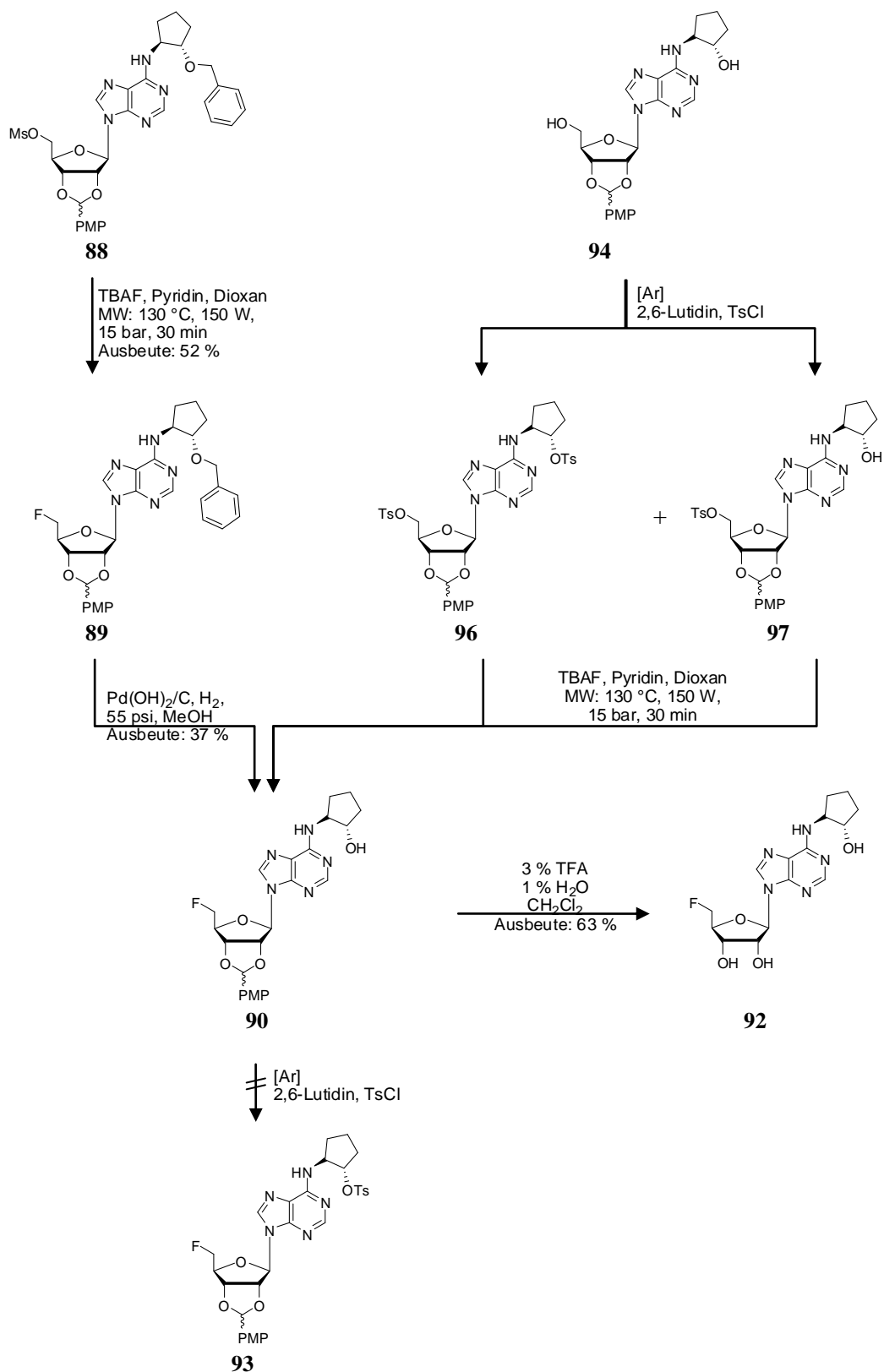


Abbildung 3.79: Zusammenfassung der Synthese von 5'-Desoxy-5'-fluor-N⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**90**). – Teil 2.

4 INDOL-DERIVATE ALS AGONISTEN FÜR DEN WAISENREZEPTOR „GPR17“

Nachdem der GPR17-Rezeptor phylogenetisch in die Gruppe der P2Y-Rezeptoren eingeordnet worden war (siehe Kapitel 1.5), wurde angenommen, dass eine Aktivierung des Rezeptors durch Nucleotide oder Nucleotid-Mimetika möglich sein sollte. Im Rahmen eines Screening-Programmes der Arbeitsgruppe Kostenis (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) wurde 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**98**) als synthetischer Agonist am GPR17-Rezeptor identifiziert (AG Kostenis, unpublizierte Daten).

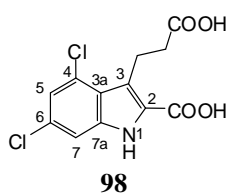


Abbildung 4.1: 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**98**).

Bei Verbindung **98** handelt es sich um ein Indol-Derivat mit zwei Chlor-Substituenten in den Positionen 4 und 6 des aromatischen Systems. Die beiden Carboxylreste am Pyrrolring sind unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) deprotoniert.

Verbindung **98** wurde ursprünglich als Antagonist der Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle des *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor), einem ionotropen Glutamat-Rezeptor, entwickelt ($IC_{50} = 170$ nM). Seine Aktivierung führt zu einer Öffnung dieses Ionenkanals. Calcium kann anschließend in die postsynaptische Zelle einströmen und so zur Signalweiterleitung beitragen. NMDA-Rezeptoren stehen im Verdacht an der Entstehung von Epilepsie,^{227,228} Morbus Alzheimer,²²⁹ Morbus Parkinson,²³⁰ Amyotropher Lateralsklerose²³¹ und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt zu sein.²³²

Zur Prüfung dieses neuen Agonisten und der später synthetisierten Derivate am GPR17 wurden von Dr. Andreas Spinrath (AK Kostenis, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) im Rahmen seiner Dissertation mehrere Testsysteme entwickelt. Dazu wurde zunächst der GPR17-Rezeptor mittels retroviraler Transfektion in 1321N1-Astrocytoma-Zellen stabil exprimiert.²³³ In weiteren Experimenten wurde der GPR17-Rezeptor zusätzlich auch mit dem Flp-InTM T-RexTM-Expressionssystem der Firma InvitrogenTM in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) eingebracht und dort stabil exprimiert. Die Aktivierung des Rezeptors durch die Verbindung **98** wurde mit drei verschiedenen, von Dr. Andreas Spinrath etablierten Assays bestimmt. Einerseits wurde die durch Verbindung **98** ausgelöste intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung, im Folgenden als Calcium-Assay bezeichnet, gemessen. Die Leitstruktur (**98**) zeigte

in beiden Zellsystemen einen GPR17-abhängigen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Der EC_{50} -Wert von Verbindung **98** betrug $1.08 \pm 0.16 \mu\text{M}$ im 1321N1-Zellsystem und $8.4 \pm 1.5 \text{ nM}$ im CHO-Zellsystem. Die beobachtete Differenz der EC_{50} -Werte ist vermutlich auf die unterschiedliche Expression des GPR17-Rezeptors in den beiden getesteten Zellsystemen und damit auf das Vorhandensein einer sogenannten Rezeptorreserve in den höher exprimierenden CHO-Zellen zurückzuführen.¹⁴⁴ So kann ein Vollagonist auch einen Maximaleffekt auslösen, indem er nur einen Teil der Gesamt-Rezeptor-Population besetzt. Die zusätzlichen, zur Auslösung des Maximaleffektes nicht unmittelbar verwendeten Rezeptoren bezeichnet man als Rezeptorreserve. Obwohl diese Rezeptoren für die Wirkung nicht direkt benötigt werden, tragen sie dennoch zum gemessenen Effekt bei. Die Potenz (EC_{50} -Wert) von Vollagonisten wird in Anwesenheit einer Rezeptorreserve erhöht.²³⁴ In den nativen CHO- bzw. 1321N1-Astrocytom-Zellen konnte kein durch Verbindung **98** ausgelöster Anstieg der Calcium-Konzentration gemessen werden. Damit ist die Calcium-Ausschüttung auf die Aktivierung des GPR17 zurückzuführen.

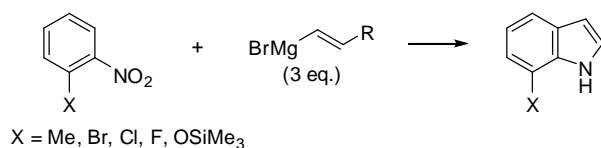
In einem weiteren von Dr. Andreas Spinrath etablierten Assay wurde die Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP_3), im Folgenden als „ IP_3 -Assay“ bezeichnet, gemessen. Eine Aktivierung des GPR17-Rezeptors in CHO-Zellen durch Verbindung **98** führte zu einer vermehrten Ausschüttung von IP_3 . Der EC_{50} -Wert betrug $0.67 \pm 0.27 \mu\text{M}$.¹⁴⁴ In 1321N1-Zellen konnte nach Aktivierung des Rezeptors keine IP_3 -Freisetzung beobachtet werden.¹⁴⁴ Möglicherweise ist in diesen Zellen ein neuer Calcium-Freisetzungs-Mechanismus, der zwar auf der Aktivierung der Phospholipase C beruhen könnte, aber kein IP_3 bildet, beteiligt.¹⁴⁴ Schließlich wurde die Aktivierung des Rezeptors durch Verbindung **98** mittels dynamischer Massen-Umverteilung (*dynamic mass redistribution*), im Folgenden als „DMR-Assay“ bezeichnet, gemessen. Für diese neue Methode wurden die transfizierten CHO- bzw. Astrocytom-Zellen als Monoschicht in einer mit einem Biosensor ausgestatteten Mikrotiterplatte ausgesät. Detektiert wird die Änderung des Brechungsindex aufgrund von Massen-Umverteilung. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Bewegung bestimmter Makromoleküle innerhalb der Zelle. Wenn die Moleküle sich in oder aus der Reichweite des Biosensors bewegen, kann eine Veränderung in der reflektierten Wellenlänge beobachtet werden. Die EC_{50} -Werte der Leitstruktur (**98**) betrugen $0.43 \pm 0.11 \mu\text{M}$ im 1321N1-Zellsystem und $0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$ im CHO-Zellsystem.¹⁴⁴ Alle drei Assays belegen, dass es sich bei Verbindung **98** um einen selektiven GPR17-Agonisten handelt, der in einer niedrigen bis hohen nanomolaren Konzentration, in Abhängigkeit vom Testsystem, den Rezeptor aktivieren kann. Damit ist die Verbindung als Leitstruktur zur Synthese neuer, potenter GPR17-Agonisten geeignet.

4.1 ALLGEMEINE SYNTHESE DER INDOL-LEITSTRUKTUR

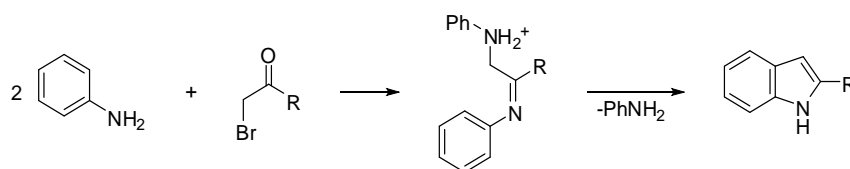
Der Indolring ist einer der weit verbreitetsten Heterocyclen in der Natur.²³⁵ Die große strukturelle Vielfalt biologisch aktiver Indole machen ihn zu einer „privilegierten Struktur“ der medizinischen Chemie.²³⁶ Die Bedeutung der essentiellen Aminosäure Tryptophan für die Ernährung sowie die Entdeckung, dass viele Alkaloide und Pflanzen-Hormone ein Indol-Grundgerüst besitzen, waren nur einige Gründe für die intensive Erforschung der Indole.²³⁶ Die Bandbreite der Anwendungen für therapeutisch wirksame Indole umfasst unter anderem Protein-kinase C-Inhibitoren, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-Agonisten (5-HT-Agonisten), Melatonin-Agonisten und Glucocorticoid-Rezeptor-Modulatoren. Seit fast 150 Jahren ist deshalb die Synthese und Funktionalisierung von Indol-Derivaten eine der zentralen Interessen der synthetischen organischen Chemie. Zahlreiche Synthesemethoden wurden für unterschiedlich substituierte Indole etabliert.^{235,237,238} Eine Zusammenstellung der am häufigst verwendeten Methoden ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Zusammenstellung der am häufigsten verwendeten Methoden zur Indolsynthese.

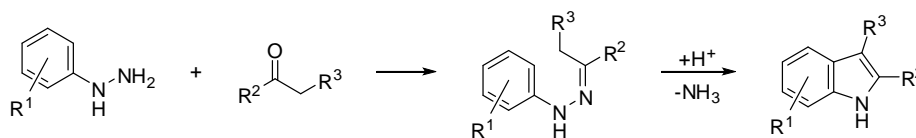
A Bartoli-Indol-Synthese²³⁹



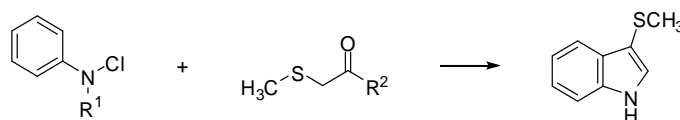
B Bischler-Möhlau-Synthese²⁴⁰



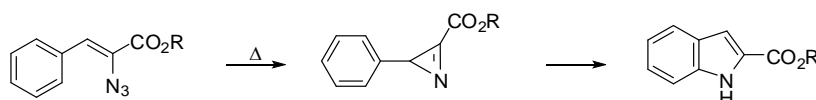
C Fischer-Indol-Synthese²⁴¹

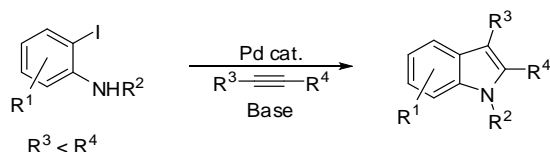
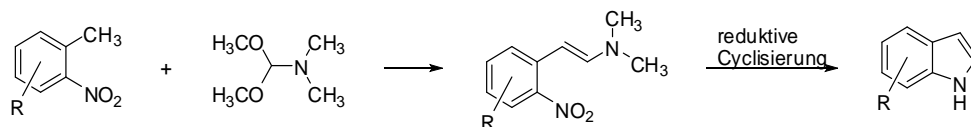
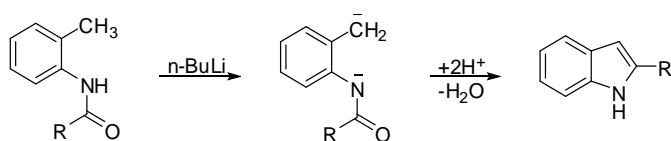
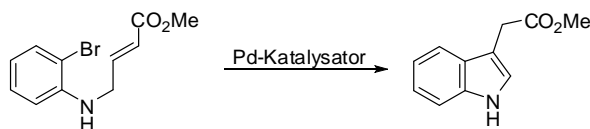
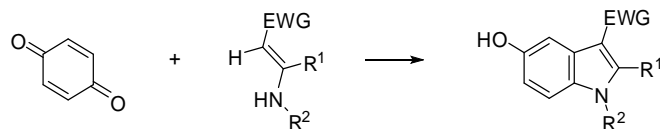
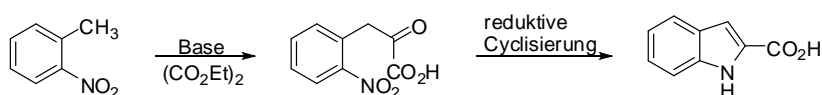
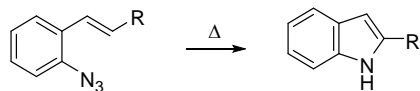


D Gassman-Indol-Synthese²⁴²



E Hemetsberger-Knittel-Synthese²⁴³



F Larock-Synthese²⁴⁴**G Leimgruber-Batcho-Synthese**²⁴⁵**H Madelung-Synthese**²⁴⁶**I Mori-Synthese**²⁴⁷**J Nenitzescu-Synthese**²⁴⁸**K Reissert-Indol-Synthese**²⁴⁹**L Sundberg-Indol-Synthese**²⁵⁰

Abkürzung: EWG = Elektronen-ziehende Gruppe (*electron-withdrawing group*)

Taber et al. veröffentlichten kürzlich eine Arbeit, in der eine Klassifizierung der zahlreichen Indolsynthesen in neun Gruppen vorgenommen wurde (siehe Abbildung 4.2). Die Klassifizierung erfolgte anhand der in der Synthese zuletzt geknüpften Bindung. Bei der Indolsynthese sind prinzipiell die vier Pyrrolbindungen als letzte Verknüpfungspunkte möglich (siehe Abbildung 4.2).

Typ 1-Reaktionen werden nach ihrem bekanntesten Vertreter auch als Fischer-Typ (siehe Tabelle 4-1C) bezeichnet.²⁴¹ In diese Gruppe lassen sich jedoch auch die Bartoli-Synthese und

die Bischler-Möhlau-Synthese einordnen (siehe Tabelle 4-1A und B).^{239,240} Der Ringschluss erfolgt bei diesen Reaktionen zwischen C3 und C3a des späteren Indols.

Die Anwendung einer intramolekularen, Palladium-katalysierten Heck-Reaktion zur Synthese von Indolen, Oxindolen und Indolinen in Abhängigkeit vom Substrat wurde unabhängig von Hegedus, Mori und Heck entwickelt (siehe Tabelle 4-1I).²⁴⁷ Diese Reaktionen werden unter **Typ 2** zusammengefasst. Obwohl die Verknüpfungsstelle die gleiche wie diejenige der Typ 1-Reaktionen ist, wurden diese Reaktionen als eigene Klasse zusammengefasst. Bei den Typ 2-Reaktionen kommt es zu einem Ringschluss unter Einbindung eines funktionalisierten aromatischen Kohlenstoffs, bei denen des Typs 1 hingegen ist dieser Kohlenstoff unsubstituiert.

Der bekannteste Vertreter des **Typs 3** ist die Hemetsberger-Reaktion (siehe Tabelle 4-1E), bei der Indol-2-carbonsäureester-Derivate aus der thermischen Zersetzung von 3-Aryl-2-azido-propionsäureestern gebildet werden.²⁴³ Der Ringschluss erfolgt bei diesen Reaktionen zwischen N1 und C7a des späteren Indols.

Reaktionen, die, wie die Buchwald-Reaktion, von einem ortho-substituierten Edukt ausgehen, werden unter **Typ 4** zusammengefasst. Auch zwischen Typ 3- und Typ 4-Reaktionen wurde aufgrund der Funktionalisierung des zu verknüpfenden Kohlenstoffs wieder unterschieden.

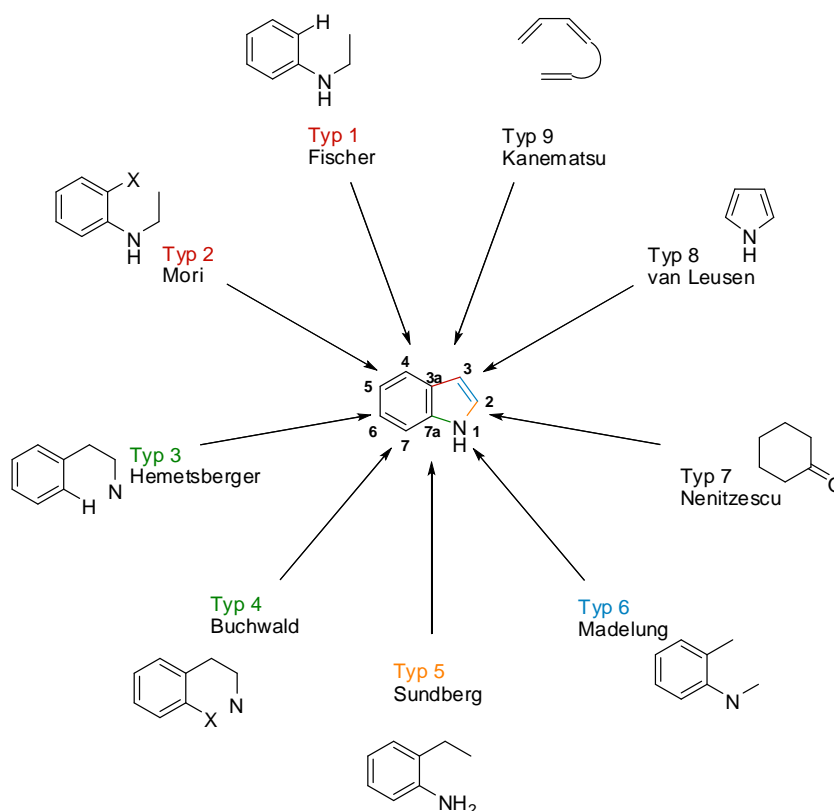


Abbildung 4.2: Die bekannten Indolsynthesen lassen sich, entsprechend der zuletzt geknüpften Bindung, in neun Gruppen einteilen; modifiziert nach Taber et al.²³⁸

Typ 5 fasst Synthesen zusammen, die als letzten Schritt eine C-N-Verknüpfung zwischen Position N1 und C2 des resultierenden Indols aufweisen. Diese Gruppe schließt neben ihrem Namensgeber Sundberg-Reaktion (siehe Tabelle 4-1L) zahlreiche, sehr bekannte Reaktionen wie die Leimgruber-Batcho-Reaktion (siehe Tabelle 4-1G), die Gassman-Reaktion (siehe Tabelle 4-1D) und die Reissert-Indol-Synthese (siehe Tabelle 4-1K) ein.^{242,245,249,250}

Bei Reaktionen des **Typs 6** wird im letzten Schritt eine C-C-Bindung zwischen C2 und C3 des resultierenden Indols geknüpft. Ihr bekanntester Vertreter ist die Madelung-Synthese (siehe Tabelle 4-1H).²⁴⁶

Bei den Reaktionen der letzten drei Gruppen wird der Phenylring des Indols erst während der Synthese gebildet und ist nicht bereits Teil des Eduktes. Bei der Nenitzescu-Reaktion (siehe Tabelle 4-1J) wird dieser aus einem Cyclohexan gebildet.²⁴⁸ Reaktionen dieser Art werden unter **Typ 7** zusammengefasst.

Typ 8-Reaktionen verwenden als Ausgangsmaterial ein Pyrrol-Derivat. Die Bildung des Benzenrings erfolgt häufig durch Diels-Alder-Reaktion.

Der gleichzeitige Aufbau beider Ringe wurde zuerst von Kanematsu et al. 1986 publiziert. Ihnen gelang es durch eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion 2-Chlorethyl-1*H*-indol-1-carbonsäureester zu synthetisieren.²⁵¹ Aufgrund der Besonderheit dieser Reaktion, wurde sie als eigene Klasse (**Typ 9**) definiert.

Wichtigste Kriterien für die Wahl der geeigneten Indolsynthese sind die Verfügbarkeit der Ausgangsstoffe und die Stabilität bereits vorhandener funktioneller Gruppen hinsichtlich der Reaktionsbedingungen. Da nachträgliche elektrophile Substitutionen bevorzugt in Position 3 des Indol-Gerüsts stattfinden, sollten sowohl die beiden Chlor-Substituenten als auch der Carboxylrest in Position 2 der Indol-Leitstruktur (**98**) im Idealfall bereits während der Ringsynthese vorhanden sein. Die gute Verfügbarkeit verschiedenster substituerter Aniline und Keto-Verbindungen machen die Fischer-Indol-Synthese für die Darstellung von Verbindung **98** zur Methode der Wahl.^{235,252}

Als Ausgangsmaterial wird dafür 3,5-Dichloranilin (**99**) verwendet, welches unter Zugabe von Natriumnitrit in verdünnter Salzsäure zum Diazonium-Salz (**100**) umgesetzt wird (siehe Abbildung 4.3). Anschließend wird dieses in einer Japp-Klingemann-Reaktion mit 2-(Ethoxycarbonyl)cyclopentanon unter Zugabe von Base zum Phenylhydrazon (**101**) weiter verarbeitet. Säurekatalysiert findet dann eine Imin/Enamin-Tautomerie des Phenylhydrazons (**101**) zu einem En-Hydrazin (**103**) statt, der eine [3,3]-sigmatrope Umlagerung, die auch als Diaza-Cope-Umlagerung bezeichnet wird, folgt. Nach einer tautomeren Umlagerung, die zur Rearomatisierung des Phenylrings führt, wird Verbindung **105** durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure in Ethanol cyclisiert. Schließlich erfolgt die Bildung des Indol-Derivates (**107**) unter Abspaltung von Ammoniak (siehe Abbildung 4.3).²⁵² Der Ester Ethyl-4,6-dichlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-

1*H*-indol-2-carboxylat (**107**) wird unter Verwendung von Lithiumhydroxid-Monohydrat in wässriger Tetrahydrofuran-Lösung abschließend verseift (siehe Abbildung 4.3).²⁵²

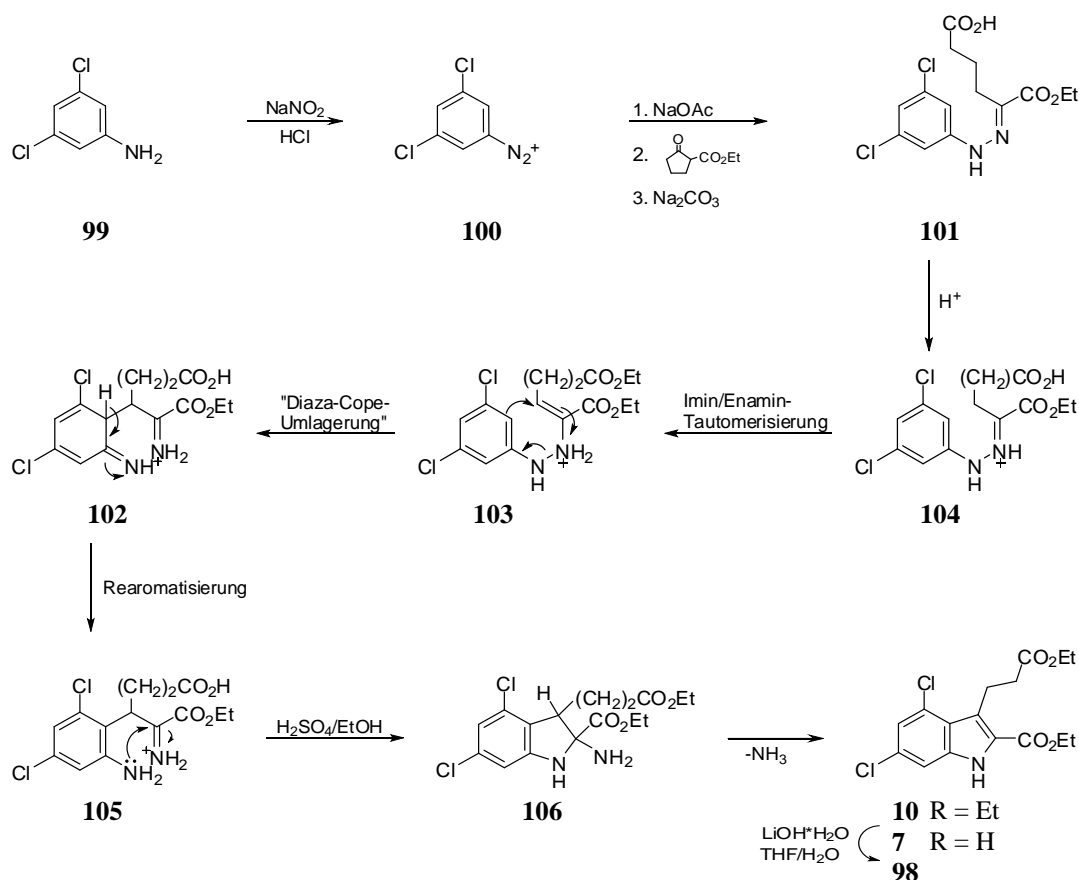


Abbildung 4.3: Diazotierung von 3,5-Dichloranilin (**99**) und Japp-Klingemann-Modifizierung der Fischer-Indol-Synthese ergeben Ethyl-4,6-dichlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**107**). Die Verseifung des Esters (**107**) erfolgt nach Salituro et al. unter Verwendung von Lithiumhydroxid-Monohydrat in wässriger Tetrahydrofuran-Lösung.²⁵²

4.2 ÜBERSICHT ÜBER BEREITS EXISTIERENDE INDOL-DERIVATE

Die ersten Verbindungen, die als Agonisten am GPR17 getestet wurden, wurden von Dr. Rhalid Akkari aus unserer Arbeitsgruppe synthetisiert. Seine Arbeiten beschäftigten sich vor allem mit N1-Alkylierungen und der Variation der Phenyl-Substituenten. Dr. Rhalid Akkari hat sich dabei vorwiegend auf Substitutionen in C5-Position des Phenylrings fokussiert. Eine Zusammenstellung der von ihm synthetisierten Verbindungen ist in Tabelle 4-2 dargestellt. Entsprechend der zuvor beschriebenen Fischer-Indol-Synthese wurden zunächst die Diester der jeweiligen Verbindungen hergestellt, die dann verseift wurden. Die erhaltenen Carbonsäuren wurden anschließend von Dr. Andreas Spinrath in Calcium-Assays an rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen und rekombinanten CHO-GPR17-Zellen getestet.¹⁴⁴ Die Ergebnisse der von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten Indol-Derivate sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Zusammenstellung der von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten Indol-Derivate.

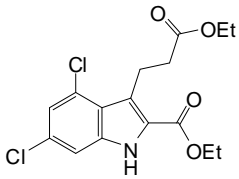
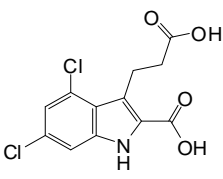
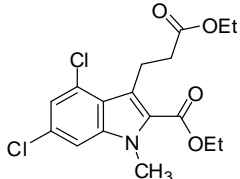
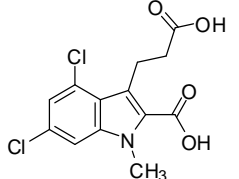
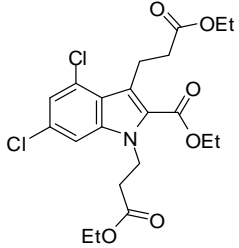
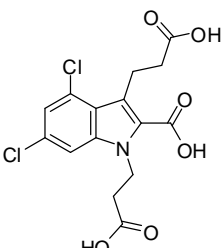
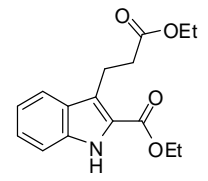
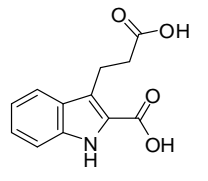
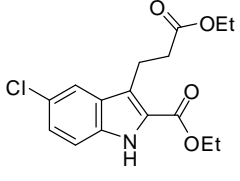
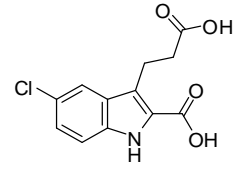
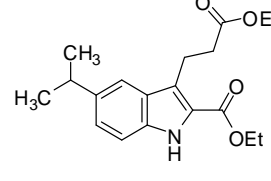
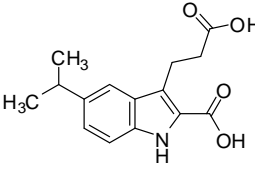
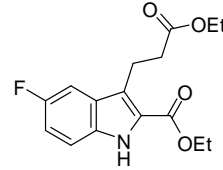
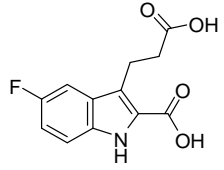
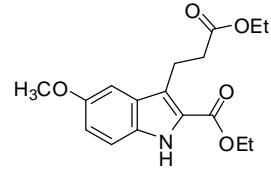
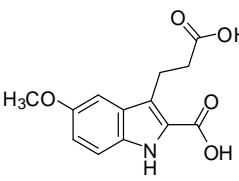
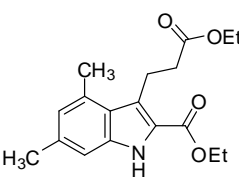
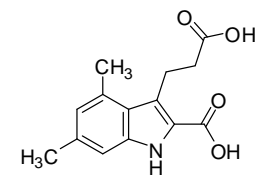
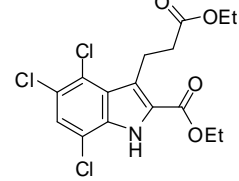
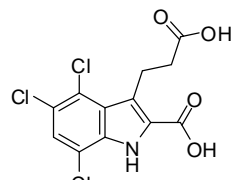
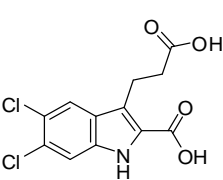
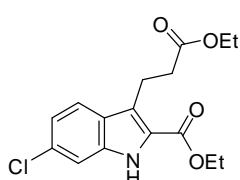
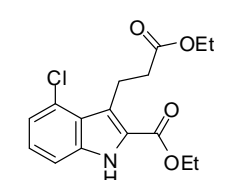
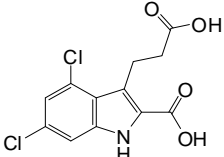
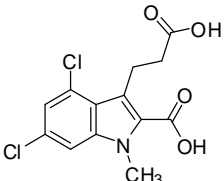
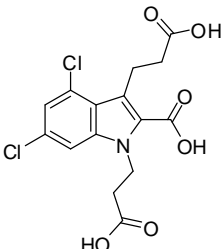
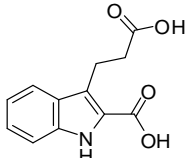
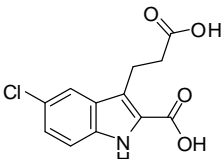
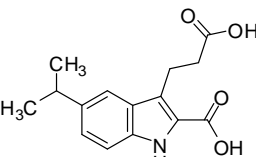
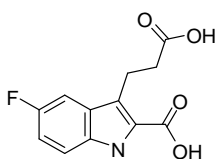
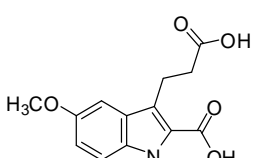
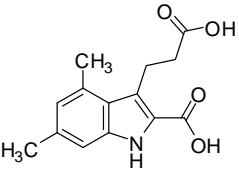
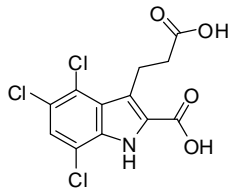
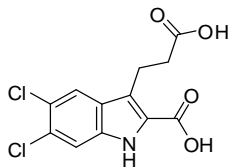
			
107 RA-III-9	98 RA-II-150	108 RA-III-10	109 RA-III-20
			
110 RA-III-37	111 RA-III-40	112 RA-III-41R	113 RA-III-56
			
114 RA-III-42R	115 RA-III-57	116 RA-III-43	
			
117 RA-III-54	118 RA-III-44	119 RA-III-52	120 RA-III-46R
			
121 RA-III-64	122 RA-III-48R	123 RA-III-55	124 RA-III-47
			
125 RA-III-65B	126 RA-III-65A	127 RA-III-69-1	128 RA-III-69-2

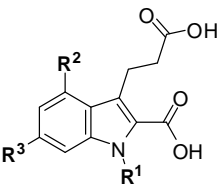
Tabelle 4-3: Bestimmung der Potenz und des maximalen Effekts der Leitstruktur (98, RA-II-150) und weiterer von Dr. Rhalid Akkari synthetisierter Indol-Derivate durch Messung der intrazellulären Freisetzung von Calcium; modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Verbindung	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17-/ CHO-GPR17-Zellen ^a	% des Maximizeffektes ± SEM (bei 30 μM) 1321N1-GPR17-/ CHO-GPR17-Zellen ^b
98 	1.08 ± 0.16 / 0.0084 ± 0.0015	100/ 100 (bei 0.3 μM)
109 	> 30 μM / 9.59 ± 2.18	16 ± 5 / 55 ± 4
111 	5.44 ± 0.94 / 0.20 ± 0.06	80 ± 6 / 85 ± 5 (bei 1 μM)
113 	> 30 μM / 17.93 ± 4.25	8 ± 2 / 64 ± 10
115 	> 30 μM / > 30 μM	11 ± 2 / 12 ± 1
117 	> 30 μM / > 30 μM	6 ± 2 / 7 ± 6
119 	> 30 μM / > 30 μM	9 ± 6 / 11 ± 7
121 	> 30 μM / > 30 μM	5 ± 3 / 7 ± 4

Verbindung	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17-Zellen ^a	% des Maximizeffektes ± SEM (bei 30 μM) 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17-Zellen ^b
123 	15.12 ± 3.83 / 0.36 ± 0.04	76 ± 6 / 68 ± 2 (bei 1 μM)
125 	> 30 μM / > 30 μM	16 ± 12 / 1 ± 1
126 	> 30 μM / > 30 μM	11 ± 8 / 6 ± 2

^aBestimmt wurden die EC₅₀-Werte von drei Verbindungen an rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen und fünf Verbindung an rekombinanten CHO-GPR17-Zellen. ^bDie Daten von 30 μM der jeweiligen Verbindung in rekombinanten 1321N1-Zellen bzw. CHO-Zellen wurden normiert auf die Werte von 30 μM Verbindung **98** in 1321N1-Zellen bzw. 0,3 μM Verbindung **98** in CHO-Zellen.

Tabelle 4-4: Bestimmung der Potenz und des maximalen Effekts der von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten Indol-Derivate durch Messung der intrazellulären Freisetzung von IP₃; modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

					
Verbindung	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ± SEM [μM] ^a	% des Maximal- effektes ± SEM (bei 100 μM) ^b
98	H	Cl	Cl	0.67 ± 0.27	100 (bei 10 μM)
111	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	Cl	9.15 ± 0.36	95 ± 1
123	H	CH ₃	CH ₃	23.41 ± 4.87	85 ± 5

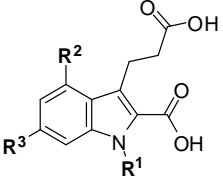
^aBestimmt wurden die EC₅₀-Werte von drei Verbindungen an rekombinanten CHO-GPR17-Zellen (n = 3 – 5). ^bDie Daten von 100 μM der jeweiligen Verbindung in rekombinanten CHO-Zellen wurden normiert auf die Werte von 10 μM Verbindung **98**.

Neben der Leitstruktur (**98**) bewirkten in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen nur die Verbindungen **111** und **123** einen messbaren Calcium-Anstieg. In rekombinanten CHO-GRP17-Zellen waren zusätzlich auch noch die Verbindungen **109** und **113** aktiv. Wie bereits bei Verbindung **98**

beobachtet, waren die Potenzen der gemessenen Verbindungen in rekombinanten CHO-GRP17-Zellen höher als in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen.

In weiteren Untersuchungen bestimmte Dr. Andreas Spinrath zusätzlich die EC_{50} -Werte der Verbindungen **111** und **123** in den sensitiveren, rekombinanten CHO-GPR17-Zellen durch Messung der Anreicherung von radioaktivem Inositoltrisphosphat (siehe Tabelle 4-4) sowie durch Messung der dynamischen Massen-Umverteilung (siehe Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Bestimmung der Potenz und des maximalen Effekts der von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten Indol-Derivate durch Messung der dynamischen Massen-Umverteilung; modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

					
Verbindung	R ¹	R ²	R ³	EC_{50} (\pm SEM) [μ M] ^a	% des Maximal-effektes \pm SEM (100 μ M) ^b
98	H	Cl	Cl	0.03 \pm 0.01	100
111	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	Cl	2.06 \pm 0.62	64 \pm 10
123	H	CH ₃	CH ₃	3.16 \pm 1.23	77 \pm 4

^aBestimmt wurden die EC_{50} -Werte von drei Verbindungen an rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ($n = 3 - 6$). ^bDie Daten von 100 μ M der jeweiligen Verbindung in rekombinanten CHO-Zellen wurden normiert auf die Werte von 10 μ M Verbindung **98**.

Auffällig ist, dass die Dosis-Wirkungskurven für die drei gemessenen Substanzen im IP₃-Assay im Vergleich zu denen, die im Calcium-Assay bestimmt wurden, nach rechts verschoben sind (siehe Tabelle 4-4). Außerdem konnte nicht genau bestimmt werden, ob Verbindung **123** als Vollagonist oder als Partialagonist wirkt, da die Dosis-Wirkungskurve bis zu einer Konzentration von 100 μ M kein Plateau erreichte.¹⁴⁴

Im DMR-Assay sind alle Verbindungen weniger potent als im Calcium-Assay, was durch eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach rechts zum Ausdruck kommt (Tabelle 4-5).

Aus den erhaltenen Daten konnten erste Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Indol-Derivate abgeleitet werden. Substitutionen in N1-Position werden demnach nur toleriert, wenn es sich um geladene Reste handelt. Die Substitution mit einer weiteren 2-Carboxyethyl-Gruppe in Position N1 (**111**) führt zwar zu einem signifikanten Rückgang der Aktivität, diese bleibt jedoch noch erhalten. Eine Substitution mit der lipophilen Methylgruppe (**109**) führt Zellsystem-abhängig entweder zu einem vollständigen Verlust oder zu einer signifikanten Re-

duktion der Aktivität. Des Weiteren wurde der Einfluss der Substituenten des Phenylrings untersucht. Die Phenyl-unsubstituierte Verbindung **113** zeigt in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zelle keine und in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen eine stark verminderte Aktivität. Ein Austausch der Chlor-Substituenten in Position C4 und C6 gegen die lipophileren Methylgruppen (**123**) führt zu einer stark verminderten Potenz der Verbindung in beiden Zellsystemen. Indol-Derivate mit verschiedenen Substituenten in Position C5 des Phenylrings sind, unabhängig vom verwendeten Zellsystem, alle am GPR17 inaktiv. Dies ist selbst in Kombination mit Chlor-Substituenten in Position C4 oder C6, die an der hohen Potenz von Verbindung **98** maßgeblich beteiligt sind, zu beobachten. Eine Zusammenfassung der von Dr. Rhalid Akkari erarbeiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

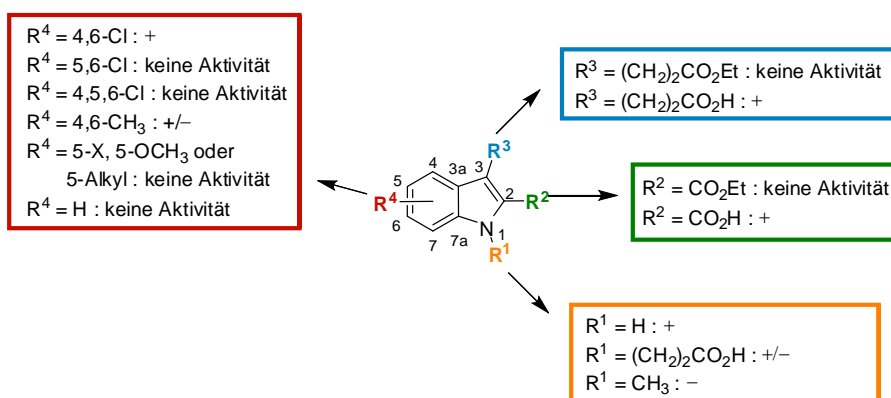


Abbildung 4.4: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Leitstruktur (**98**); „+“ = wird sehr gut toleriert; „+/-“ = führt zu einer leichten Reduktion der Aktivität; „-“ = führt zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität.

4.3 SYNTHESE NEUER INDOL-DERIVATE

Ausgehend von den von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten Verbindungen und den Struktur-Wirkungsbeziehungen, die aus den zuvor beschriebenen Ergebnissen gefolgert werden konnten, wurden weitere Indol-Derivate synthetisiert. Diese wurden ebenfalls von Dr. Andreas Spinrath (AG Kostenis, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) bzw. von Dr. Aliaa Abdelrahman (AG Müller, Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Chemie I, Universität Bonn) mit den oben beschriebenen Methoden auf ihre Aktivität am GPR17-Rezeptor getestet.

4.3.1 VARIATION DES PHENYL-SUBSTITUTIONSMUSTERS

Die Bedeutung der Chlor-Substituenten in den Positionen 4 und 6 des Phenylrings wurden zu Beginn in den Fokus der Untersuchungen gestellt. Von Dr. Rhalid Akkari wurde dazu bereits, unter Verwendung von 3-Chloranilin als Edukt, ein Isomerengemisch aus Ethyl-6-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**127**) und Ethyl-4-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-

127 R = 6-Cl
128 R = 4-Cl

129 R = 6-Cl
130 R = 4-Cl

Durch ^1H -NMR-Analyse konnte das Isomerenverhältnis sowohl für das Estergemisch als auch für das Säuregemisch auf 2 : 1 zugunsten der 6-Chlorverbindung bestimmt werden (siehe Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7).

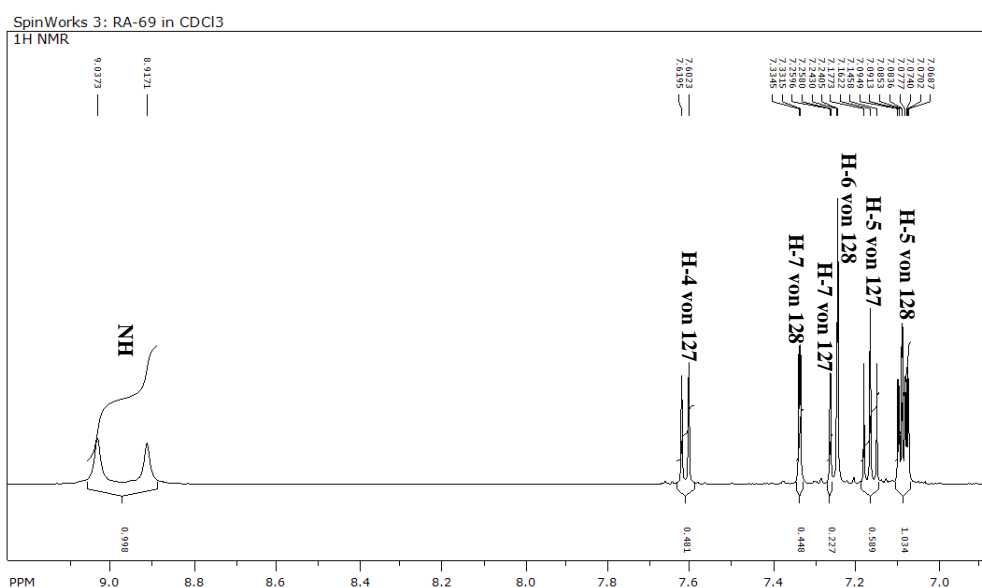
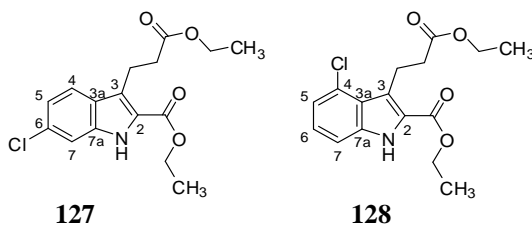


Abbildung 4.6: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum des Isomerengemisches der Ester 127 und 128.

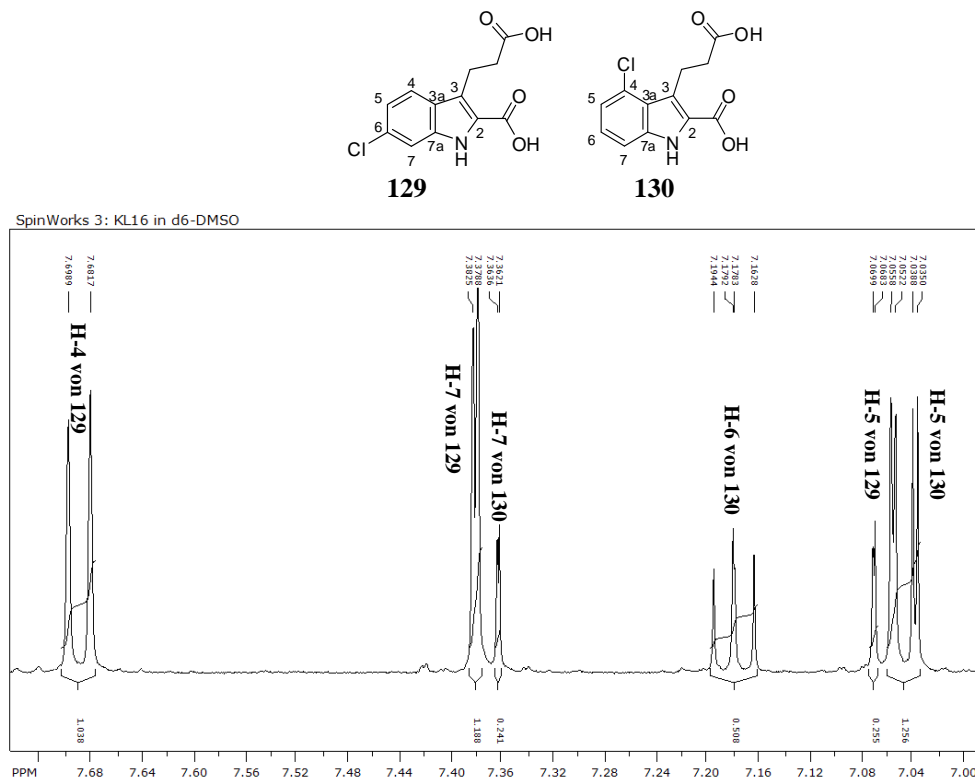


Abbildung 4.7: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum des Isomerengemisches der Carbonsäuren 129 und 130.

In einem Vorexperiment wurde von Dr. Andreas Spinrath das Carbonsäure-Isomerengemisch an rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen im Calcium-Assay getestet.¹⁴⁴

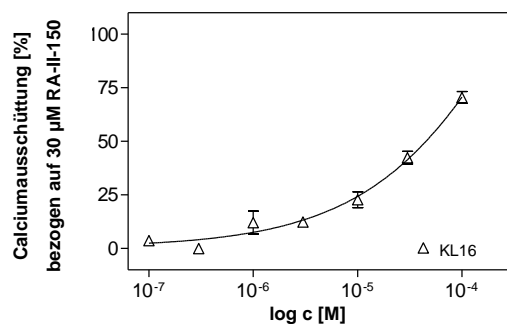


Abbildung 4.8: Die Isomerengemischung aus Verbindung 129 und 130 bewirkte in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen einen GPR17-abhängigen Calcium-Anstieg; modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Da das Carbonsäure-Isomerengemisch eine Aktivierung des GPR17 bewirken konnte (siehe Abbildung 4.8), wurden anschließend die von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten Verbindungen **127** und **128** säulenchromatographisch mit Petrolether: Ethylacetat (75:25) als Eluent voneinander getrennt und separat verseift.²⁵² Verbindung **129** wurde anschließend aus heißem Ethylacetat: Hexan (1:1) umkristallisiert und im Vakuum getrocknet. Verbindung **130** hingegen

konnte durch Umkristallisation nicht in zufriedenstellender Reinheit erhalten werden und wurde deshalb über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Die Verbindung zeigte trotz der zwei Carboxygruppen keine ausreichende Löslichkeit in einem Methanol : Wasser-Gemisch (20 : 80). Deshalb wurde die Substanz in 2 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 18 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst, durch einen Sterilfilter filtriert und mit einem Lösungsmittelgradienten von 10 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer 35 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert. Eine elementaranalytische Reinheitsbestimmung war bei denjenigen Indol-Derivaten, die unter Zusatz von Triethylamin durch präparative HPLC aufgereinigt worden waren, grundsätzlich nicht möglich. Die beiden erhaltenen Carbonsäuren **129** und **130** wurden separat in einem Calcium-Assay an beiden Zellsystemen getestet. Verbindung **129** war mit einem EC_{50} -Wert von $5.19 \pm 1.55 \mu\text{M}$ im 1321N1-Zellsystem und $23.5 \pm 4.7 \text{ nM}$ (siehe Abbildung 4.9A) im CHO-Zellsystem (siehe Abbildung 4.9B) in beiden Zellsystemen aktiv.¹⁴⁴ Verbindung **130** hingegen wies mit einem EC_{50} -Wert von $12.6 \pm 5.0 \mu\text{M}$ eine stark verminderte Aktivität in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen auf (siehe Abbildung 4.10). In 1321N1-Astrocytomzellen, die den GPR17-Rezeptor exprimieren, führte Verbindung **130** zu keiner Calciumausschüttung.¹⁴⁴ Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Chlor-Substituent in Position 6 einen bedeutenderen Anteil an der Aktivität von Verbindung **98** besitzt als derjenige in Position 4.

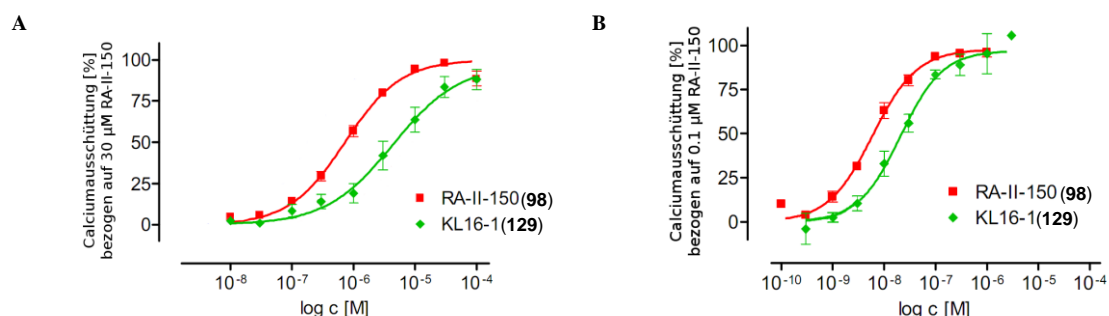


Abbildung 4.9: Konzentrationsabhängige Calciumausschüttung in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen (A) und in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen (B) (n = 3 – 29) ausgelöst durch Verbindung 129 (KL16-1) im Vergleich zu Verbindung 98 (RA-II-150); modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Verbindung **129** wurde darüber hinaus in dem von Dr. Andreas Spinrath etablierten IP_3 -Assay getestet. Der EC_{50} -Wert von Verbindung **129** wurde, da Verbindung **98** in 1321N1-Zellsystem zu keiner IP_3 -Freisetzung geführt hatte, ausschließlich im CHO-Zellsystem bestimmt und betrug $5.34 \pm 0.78 \mu\text{M}$. Schließlich wurde die Aktivierung des Rezeptors durch Verbindung **129** mittels dynamischer Massen-Umverteilung in beiden Zellsystemen gemessen. Die EC_{50} -Werte betrugen $2.46 \pm 0.88 \mu\text{M}$ im 1321N1-Zellsystem und $0.29 \pm 0.08 \mu\text{M}$ im CHO-Zellsystem.¹⁴⁴

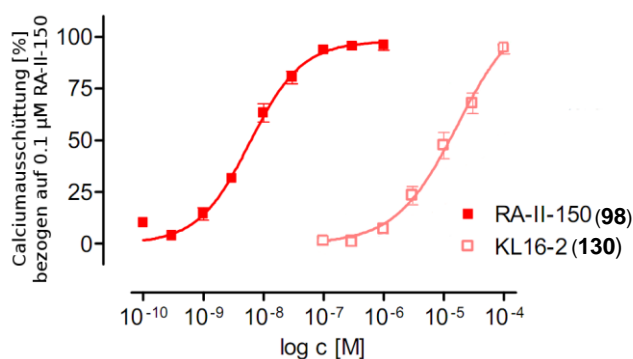


Abbildung 4.10: Konzentrationsabhängige Calciumausschüttung in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ausgelöst durch Verbindung 130 (KL16-2) im Vergleich zu Verbindung 98 (RA-II-150); modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Weitergehende Untersuchungen zur bevorzugten Substitution am Phenylring wurden unter Verwendung weiterer Chlor-substituierter Aniline unternommen. Da die von Dr. Rhalid Akkari synthetisierten 5-substituierten Indol-Derivate, unabhängig vom verwendeten Zellsystem, alle am GPR17 inaktiv waren (siehe Tabelle 4-3), wurde auf eine Substitution in Position 5 bewusst verzichtet.

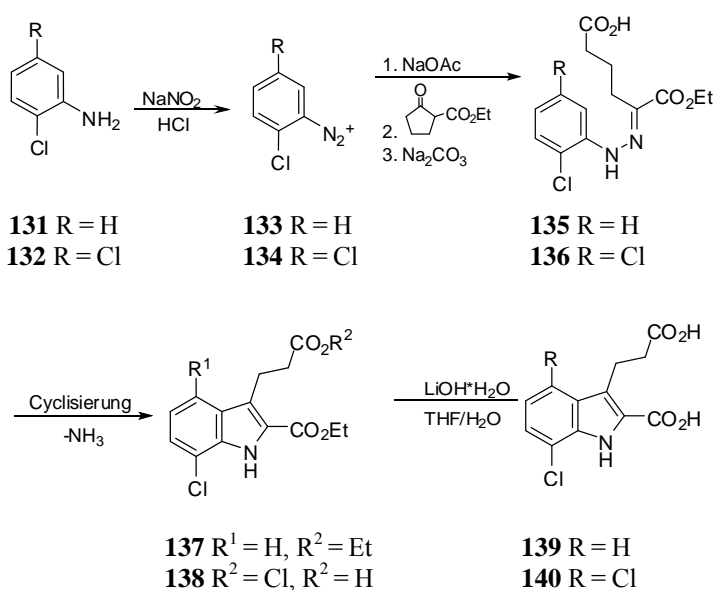


Abbildung 4.11: Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-7-chlor-1H-indol-2-carbonsäure (**139**) bzw. 3-(2-Carboxyethyl)-4,7-chlor-1H-indol-2-carbonsäure (**140**).

Nach der Methode von Salituro et al. wurden 2-Chloranilin (**131**) bzw. 2,5-Dichloranilin (**132**) mit Natriumnitrit in verdünnter Salzsäure diazotiert.²⁵² Das entstandene Diazoniumsalz (**133** bzw. **134**) wurde anschließend mit Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat zum Hydrazone (**135** bzw. **136**) umgesetzt, welches ohne Isolierung entweder mit konzentrierter Schwefelsäure in Ethanol

(für Verbindung **137**) oder mit *p*-Toluensulfonsäure in Toluol (für Verbindung **138**) cyclisiert wurde. Die erhaltenen Indolester (**137** bzw. **138**) wurden säulenchromatographisch aufgereinigt und mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in wässriger Toluol-Lösung verseift (Abbildung 4.11).²⁵²

Im Calcium-Assay führten beide Verbindungen (**139** und **140**) nur im CHO-Zellsystem zu einer Aktivierung des GPR17-Rezeptors (siehe Abbildung 4.12).

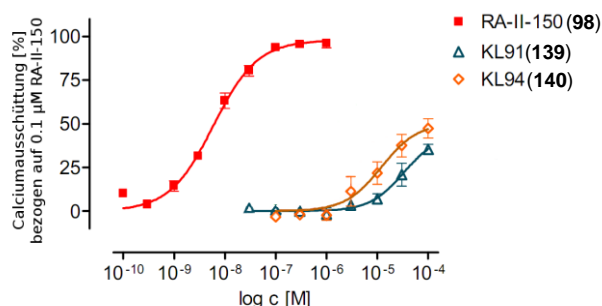


Abbildung 4.12: Konzentrationsabhängige Calciumausschüttung in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ausgelöst durch Verbindung **139** (KL91) bzw. **140** (KL94) im Vergleich zu Verbindung **98** (RA-II-150); modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Der errechnete EC_{50} für Verbindung **139** beträgt $20.7 \pm 8.1 \mu\text{M}$.¹⁴⁴ Dabei ist zu beachten, dass der Wert aus einer Extrapolation der Dosis-Wirkungskurve berechnet wurde, da bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ kein Plateau erreicht werden konnte (siehe Abbildung 4.12). Eine höhere Konzentration konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht eingesetzt werden. Das Substitutionsmuster von Verbindung **140** stellt eine Kombination aus den Substitutionsmustern von Verbindung **130** und Verbindung **139** dar. Der gemessene EC_{50} -Wert beträgt $11.4 \pm 3.1 \mu\text{M}$ und liegt damit in einer vergleichbaren Größenordnung.¹⁴⁴ Auffällig ist, dass eine Substitution in Position 7 zu einem Partialagonismus am GPR17-Rezeptor zu führen scheint (siehe Abbildung 4.12).

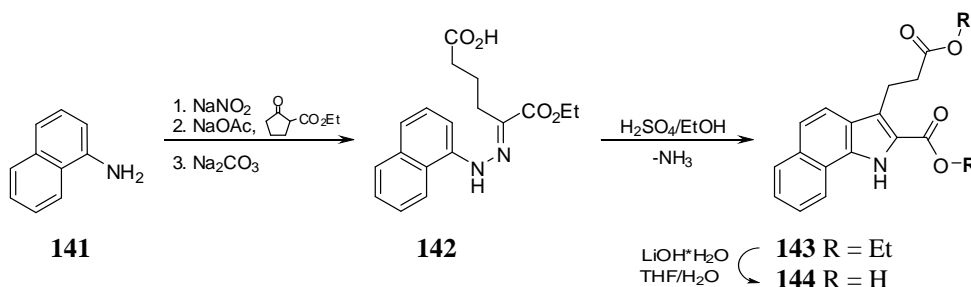


Abbildung 4.13: Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-1H-benzo[g]indol-2-carbonsäure (**144**)

Durch die Verwendung von 1-Naphthylamin (**141**) als Edukt konnte nach der Methode von Salituro et al. Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-benzo[*g*]indol-2-carboxylat (**143**) hergestellt werden (siehe Abbildung 4.13).²⁵² Die durch Verseifung des Esters entstandene 3-(2-Carboxyethyl)-1*H*-benzo[*g*]indol-2-carbonsäure (**144**) stellt eine - im Vergleich zur Leitstruktur - um einen Aromaten erweiterte Struktur dar.

Obwohl Verbindung **144** sterisch wesentlich anspruchsvoller ist als die Leitstruktur (**98**), konnte ein EC₅₀-Wert von $18.1 \pm 6.9 \mu\text{M}$ im CHO-GPR17-Zellsystem und somit eine schwache Aktivität am GPR17-Rezeptor nachgewiesen werden.¹⁴⁴

Um den Einfluss der Elektronendichte, der Elektronegativität und der Größe der Phenyl-Substituenten zu überprüfen, wurde außerdem zunächst das Difluor-Derivat 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-difluor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**148**) nach der Vorschrift von Salituro et al. hergestellt (siehe Abbildung 4.14).²⁵²

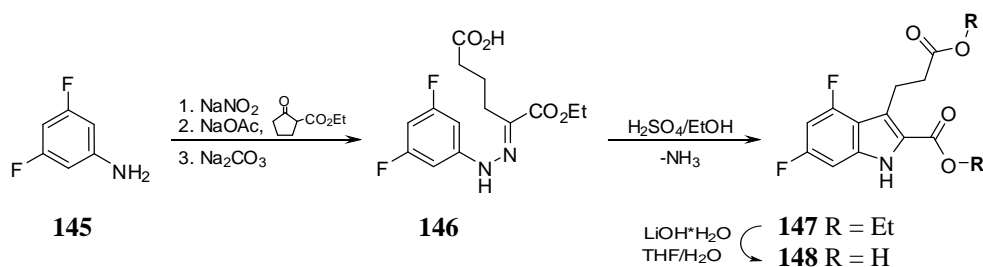


Abbildung 4.14: Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-difluor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**148**).

Verbindung **148** war in der Lage, den GPR17-Rezeptor in beiden getesteten Systemen zu aktivieren. Der EC₅₀ lag mit $8.10 \pm 2.26 \mu\text{M}$ in 1321N1-Astrocytom-Zellen und $0.17 \pm 0.04 \mu\text{M}$ in CHO-Zellen im niedrigen mikromolaren bzw. submikromolaren Bereich.¹⁴⁴ Verbindung **148** wurde darüber hinaus im IP₃-Assay getestet. Der EC₅₀-Wert von Verbindung **148** wurde ausschließlich im CHO-Zellsystem bestimmt und betrug $21.9 \pm 8.4 \mu\text{M}$.¹⁴⁴ Schließlich wurde die Aktivierung des Rezeptors durch Verbindung **148** in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen mittels dynamischer Massen-Umverteilung gemessen und ergab einen EC₅₀-Wert von $9.33 \pm 10.5 \mu\text{M}$.¹⁴⁴ Sowohl im IP₃-Assay als auch im DMR-Assay ist der EC₅₀-Wert im Vergleich zu dem in Calcium-Assay bestimmten erneut nach rechts verschoben.

In einem weiteren Ansatz sollten die beiden Isomere des Monotrifluor-Derivates, Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat und Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-6-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat, hergestellt werden.

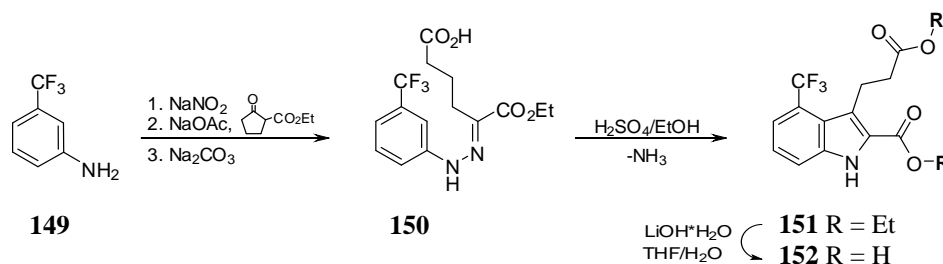


Abbildung 4.15: Darstellung von Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**151**) und anschließende Verseifung zu 3-(2-Carboxyethyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carbonsäure (**152**)

Dazu wurde 3-(Trifluormethyl)anilin (**149**) nach Vorschrift von Salituro et al. bei 0 °C mit Natriumnitrit in Salzsäure-Lösung diazotiert. Nach Zugabe von Ethyl-2-oxo-cyclopentan-carboxylat wurde das Hydrazon-Zwischenprodukt erhalten, das ohne Aufreinigung mit Schwefelsäure in Ethanol cyclisiert wurde (siehe Abbildung 4.15). Das Rohprodukt wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat, 75 : 25) aufgereinigt. Die Analyse des Produktes mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie zeigte, dass nur ein Isomer erhalten worden war (siehe Abbildung 4.16). Vermutlich ist dies auf eine selektive Isolierung bei der Aufreinigung zurückzuführen, sodass das andere Isomer nicht isoliert wurde. Dass es sich bei dem isolierten Isomer um Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**151**) und nicht um das in Position 6 substituierte Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-6-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat handelt, konnte durch ¹H-NMR-Spektroskopie und die zweidimensionale COSY-Spektroskopie (*correlation spectroscopy*) bestätigt werden (siehe Abbildung 4.16). Im ¹H-Spektrum sind im Bereich zwischen 7 und 8 ppm drei aromatische Wasserstoffatome erkennbar (siehe Abbildung 4.16B). Die Signale bei 7,58 und 7,50 ppm zeigen je ein Dublett mit einer mittleren ³J-Kopplungskonstante von 8,3 bzw. 7,4 Hz. Das Pseudotriplett bei 7,32 ppm weist eine Kopplungskonstante von 7,8 Hz auf. Damit koppelt dieses Wasserstoffatom jeweils über drei Bindungen zu den Signalen bei 7,58 und 7,50 ppm. Dies konnte durch COSY-Spektroskopie bestätigt werden (siehe Abbildung 4.16C). Ein solches Kopplungsmuster ist nur für Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**151**) zu erwarten. Läge Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-6-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat vor, müssten sowohl eine ³J-Kopplung des C5-Wasserstoffs zu C4-H als auch eine kleinere ⁴J-Kopplung zu C7-H sichtbar sein. Die Verseifung unter Standardbedingungen lieferte 3-(2-Carboxyethyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carbonsäure (**152**) (siehe Abbildung 4.15). Ähnlich wie das 4-Chlorindol-Derivat (**130**) war auch Verbindung **152** nicht in der Lage, den GPR17-Rezeptor in CHO-Zellen zu aktivieren.

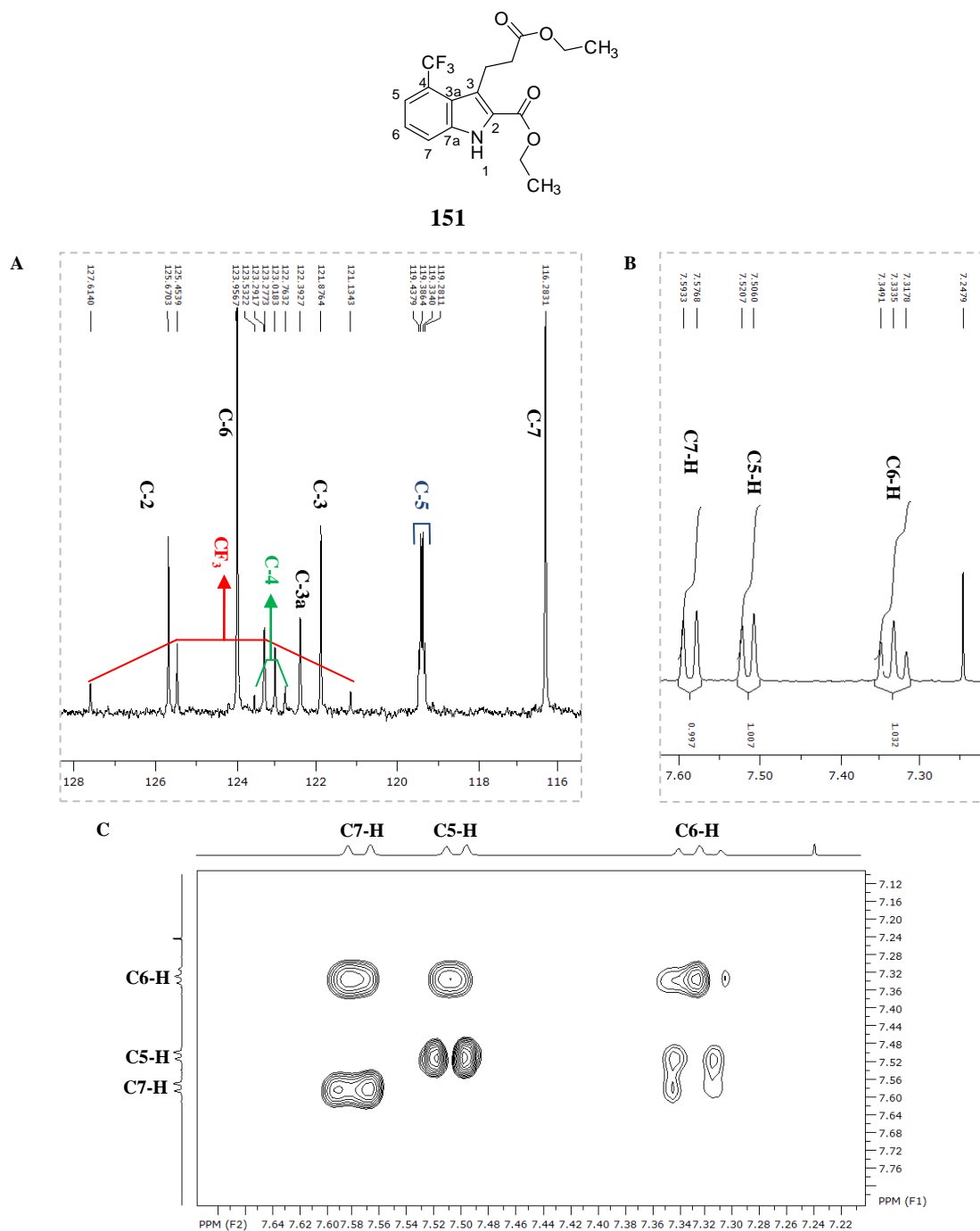


Abbildung 4.16: Strukturformel und NMR-Spektroskopie von Verbindungen 151. A) Ausschnitt aus dem ^{13}C -Spektrum. B) Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum. C) Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum.

Analog zu den beiden Monochlor-Verbindungen sollten auch die beiden Isomere der Monofluor-Verbindungen **153** und **154** hergestellt werden. Da die vorher verwendete Methode nach Salituro et al.²⁵² nur zu sehr unbefriedigenden Ausbeuten führte, wurde für diese Synthese die von Bigge et al. patentierte Vorschrift zur Fischer-Indol-Synthese von 2-Carboxyindolen verwendet.²⁵³

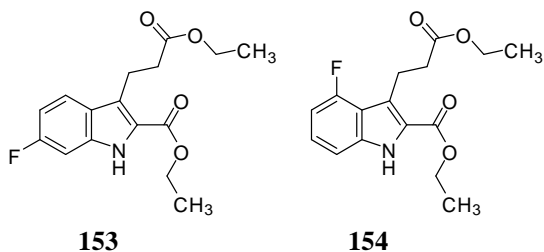


Abbildung 4.17: 3-(2-Carboxyethyl)-6-fluor-1*H*-indol-2-carbonsäure und 3-(2-Carboxyethyl)-4-fluor-1*H*-indol-2-carbonsäure.

Dazu wurde das Edukt 3-Fluoranilin (**156**) in Toluol suspendiert, zu der verdünnten und gekühlten Salzsäure gegeben und mit wässriger Natriumnitrit-Lösung diazotiert. In der Zwischenzeit wurde in einem separaten Kolben Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) mit einer auf 0 °C gekühlten, wässrigen 2,4-molaren Kaliumhydroxid-Lösung extrahiert. Das nicht verbrauchte Cyclopentanon wurde mit Toluol rückextrahiert. Die wässrige Phase wurde gesammelt und die organische Toluol-Phase wurde nochmals mit Kaliumhydroxid-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend auf Eis gegeben. Durch Zugabe des Diazoniumsalzes bildete sich ein Niederschlag, der mit Dichlormethan extrahiert wurde. Die Dichlormethan-Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Einengen der Lösung im Vakuum wurde der Rückstand mit Diethylether und Hexan versetzt. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet (siehe Abbildung 4.18).

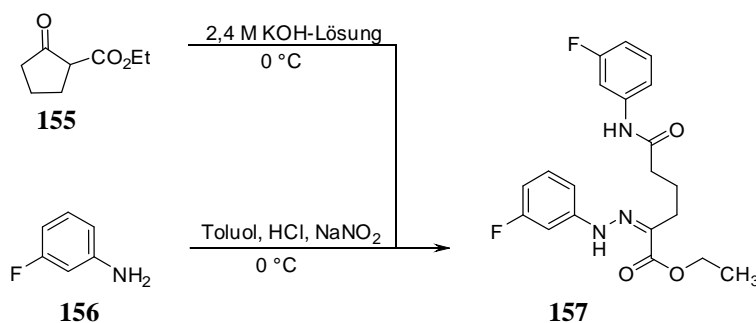


Abbildung 4.18: Bei der Indol-Synthese nach Bigge et al. ist es gleichzeitig mit der Bildung des Hydrazons auch zur Entstehung einer Amid-Bindung gekommen.

Die Analyse des isolierten Hydrazons erfolgte durch NMR-Spektroskopie (siehe Abbildung 4.19). Es zeigte sich, dass es im Laufe der Reaktion zu einer Amid-Bildung zwischen dem Edukt 3-Fluoranilin und der freien Carbonsäure in Position 3 gekommen war (siehe Abbildung 4.18). Vermutlich ist bei der Extraktion von Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat mit Kaliumhydroxid die Verbindung nicht vollständig deprotoniert und extrahiert worden. Dadurch kam es dann bei

Vereinigung der beiden Lösungen zu einem Anilin-Überschuss. Das nicht verbrauchte Anilin hat dann in einer Amid-Bildung mit dem bereits gebildeten Hydrazon reagiert.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind deutlich die überzähligen aromatischen Kohlenstoffatome erkennbar (siehe Abbildung 4.19).

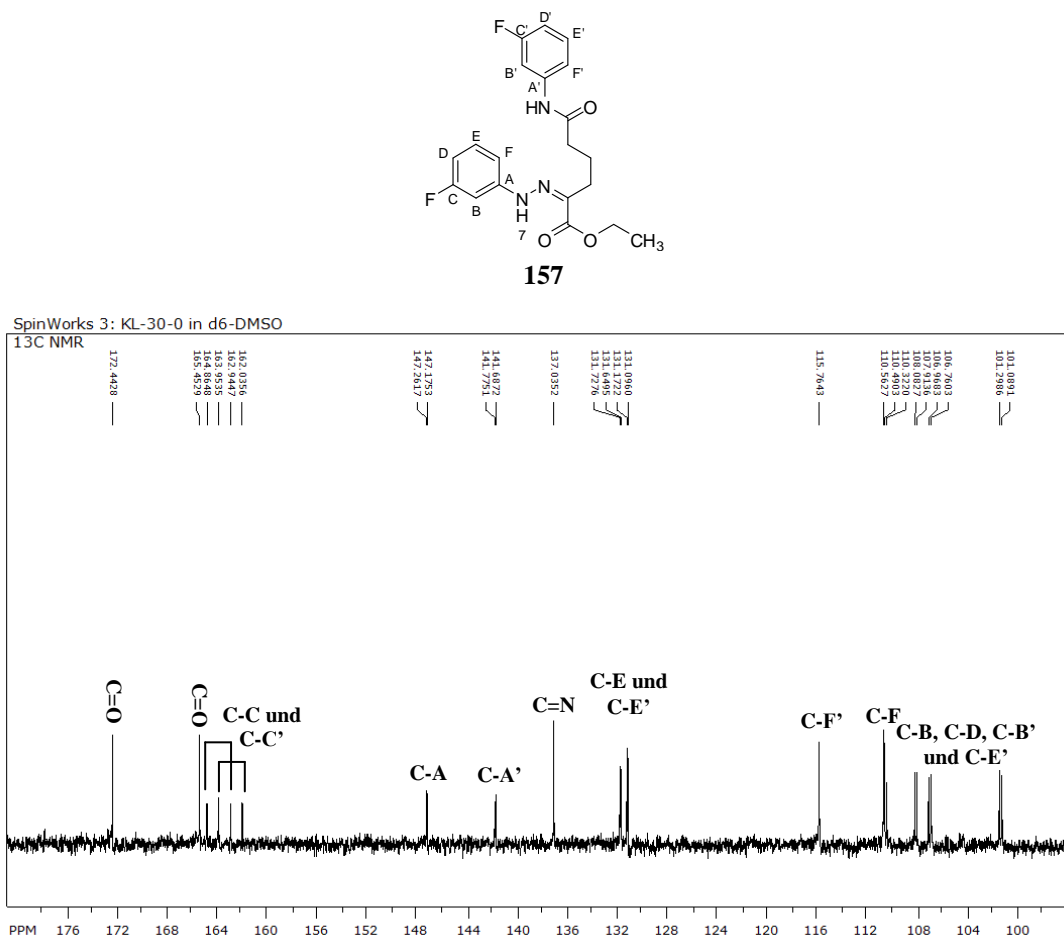


Abbildung 4.19: Ausschnitt aus dem ^{13}C -Spektrum von Verbindungen 157.

Die Zuordnung der aromatischen Kohlenstoffatome erfolgte über Bestimmung der Kohlenstoff-Fluor-Kopplung (siehe Abbildung 4.20).

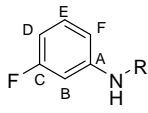
Struktur	$^1J(\text{C-C} \leftrightarrow \text{F})$	$^2J(\text{C-B} \leftrightarrow \text{F} \text{ oder } \text{C-D} \leftrightarrow \text{F})$	$^3J(\text{C-E} \leftrightarrow \text{F} \text{ oder } \text{C-A} \leftrightarrow \text{F})$
	165 Hz	21 – 26 Hz	10 – 11 Hz

Abbildung 4.20: $^nJ(\text{C},\text{F})$ -Kopplungskonstanten innerhalb des Phenylrestes.

Die Kopplungskonstante zwischen Kohlenstoff C-C und Fluor ist mit 165 Hz am deutlichsten zu erkennen. Kopplungskonstanten im Bereich zwischen 20 und 25 Hz identifizieren Kohlenstoff-

atome im Abstand von zwei Bindungen (C-B und Fluor bzw. C-D und F), und solche zwischen 10 und 12 Hz weisen auf Atome im Abstand von drei Bindungen zum Fluoratom hin (siehe Abbildung 4.20). Kleinere Kopplungskonstanten sind theoretisch möglich, konnten jedoch nicht beobachtet werden.

Obwohl die Amid-Bildung nicht beabsichtigt war, wurde Verbindung **157** trotzdem cyclisiert und anschließend verseift.

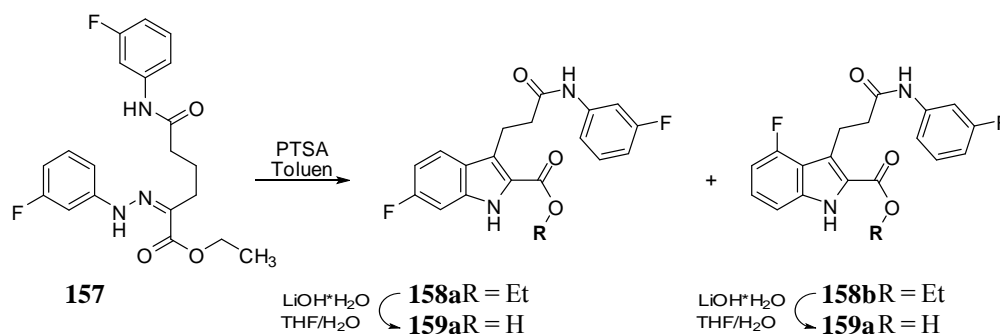


Abbildung 4.21: Darstellung des Isomerengemischs aus Ethyl-6-fluor-3-(3-(3-fluorphenylamino)-3-oxopropyl)-1H-indol-2-carboxylat (**158a**) und Ethyl-4-fluor-3-(3-(3-fluorphenyl-amino)-3-oxopropyl)-1H-indol-2-carboxylat (**158b**).²⁵³

Dazu wurde das Hydrazon mit zwei Äquivalenten *p*-Toluensulfonsäure in getrocknetem Toluol drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf 0 °C gekühlt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert und die wässrige Phase gesammelt. Diese wurde einmal mit Ethylacetat gewaschen und wieder auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure vorsichtig auf pH 1 angesäuert, wobei das Produkt ausfiel und abfiltriert wurde.²⁵³ Der Niederschlag wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat, 60 : 40) aufgereinigt (siehe Abbildung 4.21). Bei der Cyclisierung des Hydrazons erhielt man, wie bei der Verwendung von 3-substituierten Anilinen als Ausgangsmaterial üblich, eine Mischung zweier Regioisomere (siehe Abbildung 4.21). Die Verseifung der Indol-Carboxylester **158a** und **158b** führte dazu, dass nur eine freie Säurefunktion im Molekül vorhanden ist. Eine Testung dieser Verbindungen (**158a** und **158b**) im Calcium-Assay wurde durchgeführt. Wie zu erwarten war, konnte jedoch keine Aktivität festgestellt werden.¹⁴⁴ Die isolierte und aufgereinigte, noch nicht cyclisierte Verbindung **160** wurde ebenfalls unter Standard-Bedingungen verseift²⁵² (siehe Abbildung 4.22) und an rekombinanten CHO-GPR17-Zellen getestet. Erwartungsgemäß konnte aber auch hier keine Aktivität festgestellt werden.¹⁴⁴

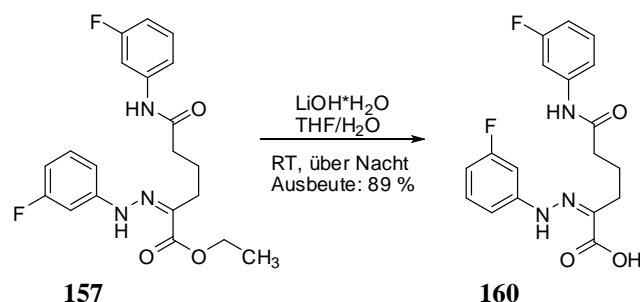


Abbildung 4.22: Darstellung von 2-(2-(3-Fluorphenyl)hydrazono)-6-(3-fluorphenylamino)-6-oxohexansäure (160).

Die Vorschrift zur Indolsynthese nach Bigge et al. wurde ebenfalls verwendet, um 3,5-Dimethoxyanilin (**161**) zum Hydrazon **162** umzusetzen (siehe Abbildung 4.23). Dabei wurde der Ester 5-(2-(3,5-Dimethoxyphenyl)hydrazono)-6-ethoxy-6-oxohexansäure (**162**) in einer Ausbeute von 29 % erhalten.²⁵³

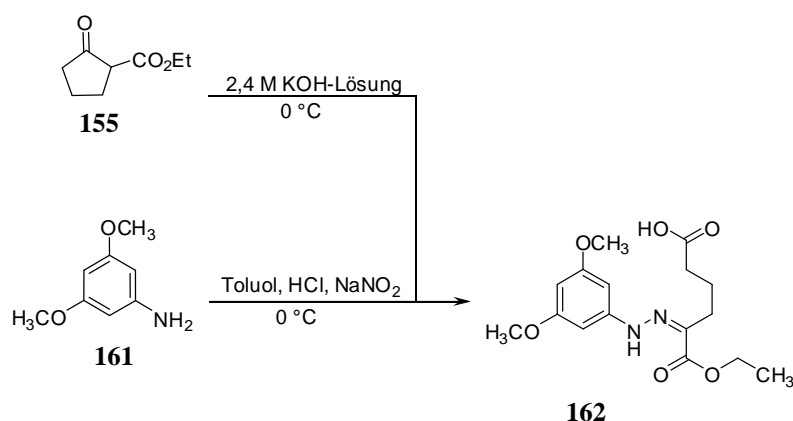


Abbildung 4.23: Darstellung von 5-(2-(3,5-Dimethoxyphenyl)hydrazono)-6-ethoxy-6-oxohexansäure (162) nach Bigge et al.²⁵³

Weiterhin wurde 3,5-Dimethoxyanilin (**161**) auch nach der bereits beschriebenen Vorschrift von Salituro et al. umgesetzt (siehe Abbildung 4.24).²⁵² Dabei wurde erwartungsgemäß der Diester Diethyl-2-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)hydrazono)hexandioat (**163**) erhalten. Ferner wurde eine von Poriel et al. veröffentlichte Vorschrift zur Synthese von Indolderivaten getestet.²⁵⁴ Dazu wurde das Anilin (**161**) in Wasser bei 0 °C suspendiert und unter Zugabe von Salzsäure und Natriumnitrit-Lösung diazotiert. Diese Lösung wurde dann 20 min bei 0 °C gerührt. In der Zwischenzeit wurden in einem separaten Kolben eine 8,7 M Kaliumhydroxid-Lösung bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung aus einem Äquivalent des Ketons (**155**) in Ethanol gegeben (Lösung 2). Die erste Lösung wurde bei 0 °C mit Eis versetzt und Lösung 2 wurde zügig hinzugegeben. Die resultierende Mischung wurde für 15 min auf 40 °C erwärmt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Diethylether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter

vermindertem Druck eingeeengt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat, 30 : 70). Als Produkt wurde ebenfalls der Diester Diethyl-2-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)hydrazono)hexandioat (**163**) in einer Ausbeute von 10 % erhalten (siehe Abbildung 4.24).

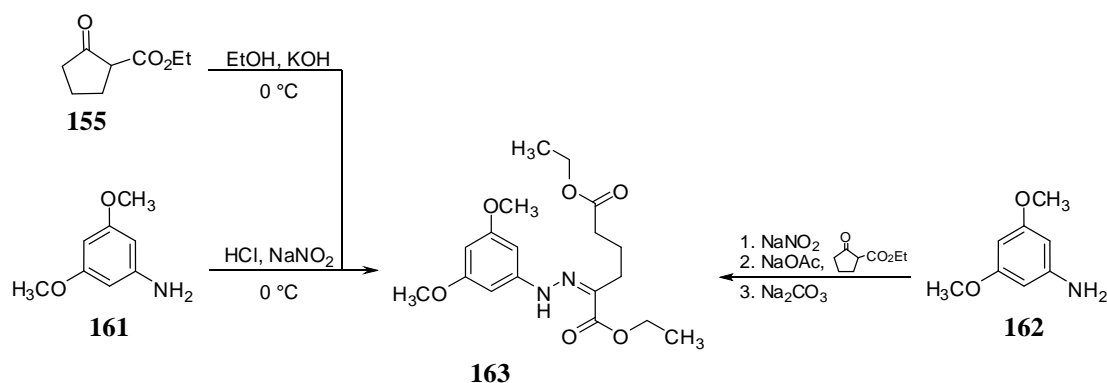


Abbildung 4.24: Darstellung von Diethyl-2-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)-hydrazono)hexandioat (**163**) nach Poriel et al und Salituro et al.^{252,254}

Die Cyclisierung von Verbindung **162** zum Indol-Derivat wurde anschließend mit *p*-Toluensulfonsäure in 10 ml getrocknetem Toluol durchgeführt (siehe Abbildung 4.25).²⁵³

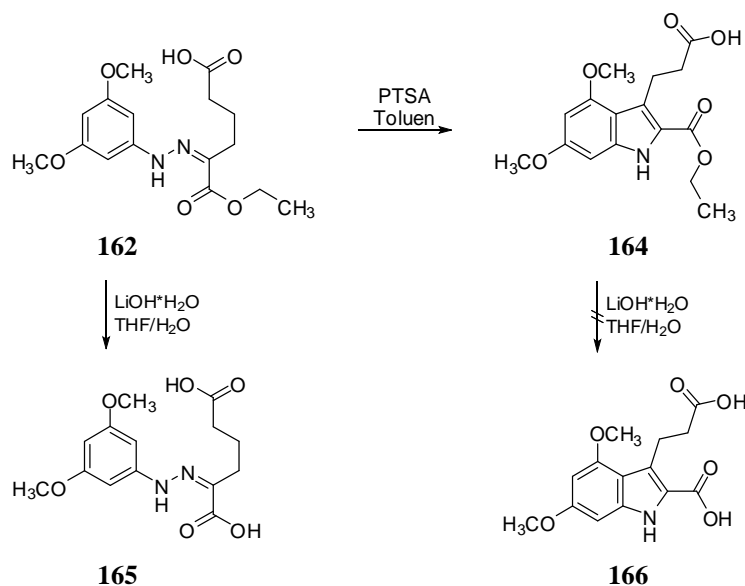


Abbildung 4.25: Darstellung von 3-(2-(Ethoxycarbonyl)-4,6-dimethoxy-1H-indol-3-yl)propansäure (**164**).

Der entstandene Niederschlag wurde über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 2 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 18 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 20 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer 40 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde in 32 %iger

Ausbeute als 1 : 3 - Triethylamin-Salz erhalten. Verbindung **164** ist von besonderem Interesse, da nur eine der beiden Carboxygruppen verestert ist. Die bisher getesteten Verbindungen besaßen alle ausschließlich freie Carbonsäuregruppen bzw. Carbonsäureestergruppen. Dabei stellte sich heraus, dass die Diester im Gegensatz zur freien Säure scheinbar keine Aktivität aufwiesen. Der Monoester **164** besitzt nun eine Carbonsäuregruppe in Position 2 und eine Propionsäureester-Gruppe in Position 3. Die Verbindung bewirkte in CHO-Zellen keine Aktivierung des GPR17-Rezeptors.¹⁴⁴ Eine Verseifung dieser Verbindung unter Standard-Bedingungen führte jedoch zur Zersetzung. Somit ist noch keine genaue Aussage möglich, ob beide Carbonsäurefunktionen für die Aktivität der Leitstruktur notwendig sind. Eventuell ist es möglich, Verbindung **164** durch eine andere Methode zu verseifen. Zusätzlich wurde die noch nicht cyclisierte Verbindung **162** mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in THF/Wasser verseift und anschließend getestet. Auch diese Verbindung zeigte keine Aktivität in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen.

In früheren Experimenten war bereits der Einfluss der kleinen, stark elektronegativen Fluor-Substituenten am Aromaten auf die Aktivität der Verbindung am GPR17-Rezeptor überprüft worden. Im Folgenden wurde nun ein weiterer Halogenaustausch der Chloratome gegen das größere und weniger elektronegative Brom durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Amino-Gruppe des käuflich erwerblichen 2,6-Dibromnitroanilins (**167**) durch Zugabe von Natriumnitrit in schwefelsaurem Ethanol abgespalten (siehe Abbildung 4.26). Eine anschließende Reduktion der Nitrogruppe von Verbindung **168** mit Zinnpulver in salzsaurer Lösung lieferte 3,5-Dibromanilin (**169**).

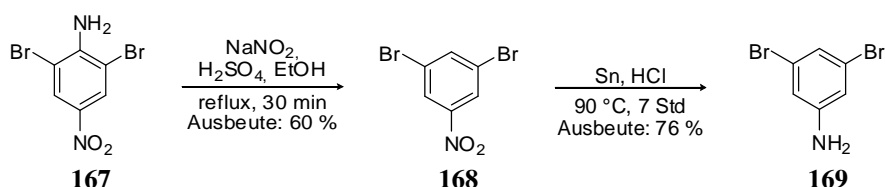


Abbildung 4.26: Darstellung von 3,5-Dibromanilin (**169**).

Verbindung **169** wurde dann nach Poriel et al. wie oben beschrieben mit Natriumnitrit diazotiert und anschließend mit Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat umgesetzt.²⁵⁴ Es resultierte eine Mischung aus 5-(2-(3,5-Dibromphenyl)hydrazono)-6-ethoxy-6-oxohexansäure (**170**) (33 % Ausbeute), Diethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)hexandioat (**171**) (5 % Ausbeute) und Ethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)-6-(3,5-dibromphenylamino)-6-oxohexanoat (**172**) (7 % Ausbeute) (siehe Abbildung 4.27).

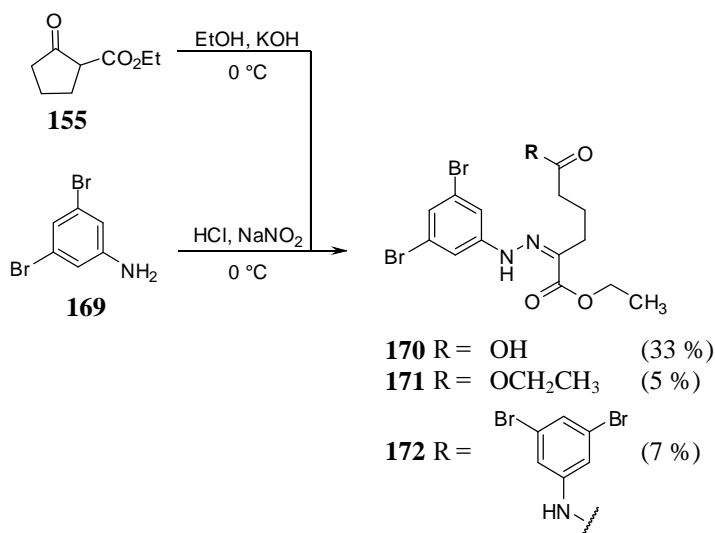


Abbildung 4.27: Die Umsetzung von 3,5-Dibromanilin (**169**) mit Natriumnitrit und Ethyl-2-oxocyclopentylcarboxylat (**155**) ergibt eine Mischung aus 5-(2-(3,5-Dibromphenyl)hydrazono-6-ethoxy-6-oxohexansäure (**170**), Diethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)hexandioat (**171**) und Ethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)-6-(3,5-dibromphenylamino)-6-oxohexanoat (**172**).

Aufgrund der besseren Reinheit wurde Diethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)hexandioat (**171**) nach der Vorschrift von Watson et al. mit Polyphosphorsäure (PPA) in Toluol cyclisiert²⁵⁵ und anschließend nach Salituro et al. mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in wässrigem Tetrahydrofuran verseift (siehe Abbildung 4.28).²⁵²

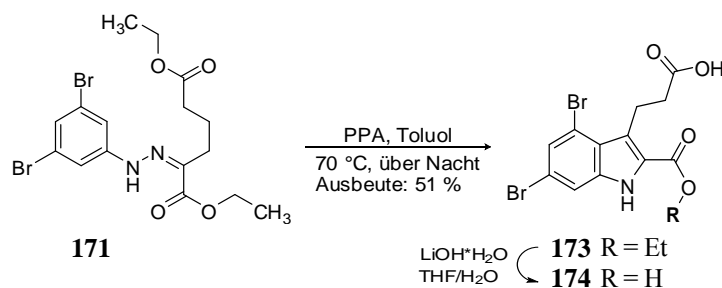


Abbildung 4.28: Darstellung von Ethyl-4,6-dibrom-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**173**) und anschließende Verseifung zu 4,6-Dibrom-3-(2-carboxyethyl)-1*H*-indol-2-carbonsäure (**174**).

Der im Calcium-Assay bestimmte EC₅₀-Wert für Verbindung **174** beträgt in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen 0.20 ± 0.01 μM (siehe Abbildung 4.12A).¹⁴⁴ Damit ist diese Verbindung 4–5fach aktiver als die bisherige Leitstruktur (**98**). In rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ist das Dibrom-Derivat mit einem EC₅₀-Wert von 15.0 ± 4.3 nM in einer ähnlichen Größenordnung aktiv wie die Leitstruktur (**98**) (siehe Abbildung 4.12B).¹⁴⁴ Große, gering elektroneegative Reste wie Brom in Position 4 und 6 des Indols scheinen für den GPR17-Rezeptor also besonders günstig zu sein.

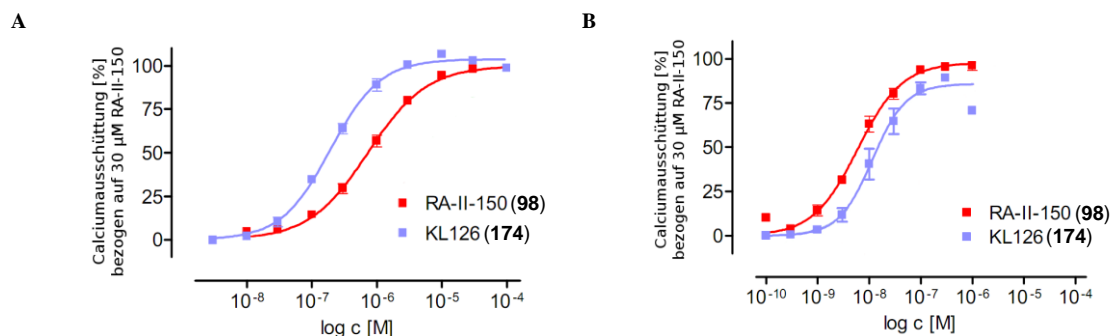


Abbildung 4.29: Konzentrationsabhängige Calciumausschüttung in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen (A) bzw. CHO-GPR17-Zellen (B) ausgelöst durch Verbindung 174 (KL126) im Vergleich zu Verbindung 98 (RA-II-150); modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

4.3.2 INDOLSYNTHESEN IN DER MIKROWELLE

Vara et al. publizierten 2008 eine Bischler-Indolsynthese in der Mikrowelle.²⁵⁶

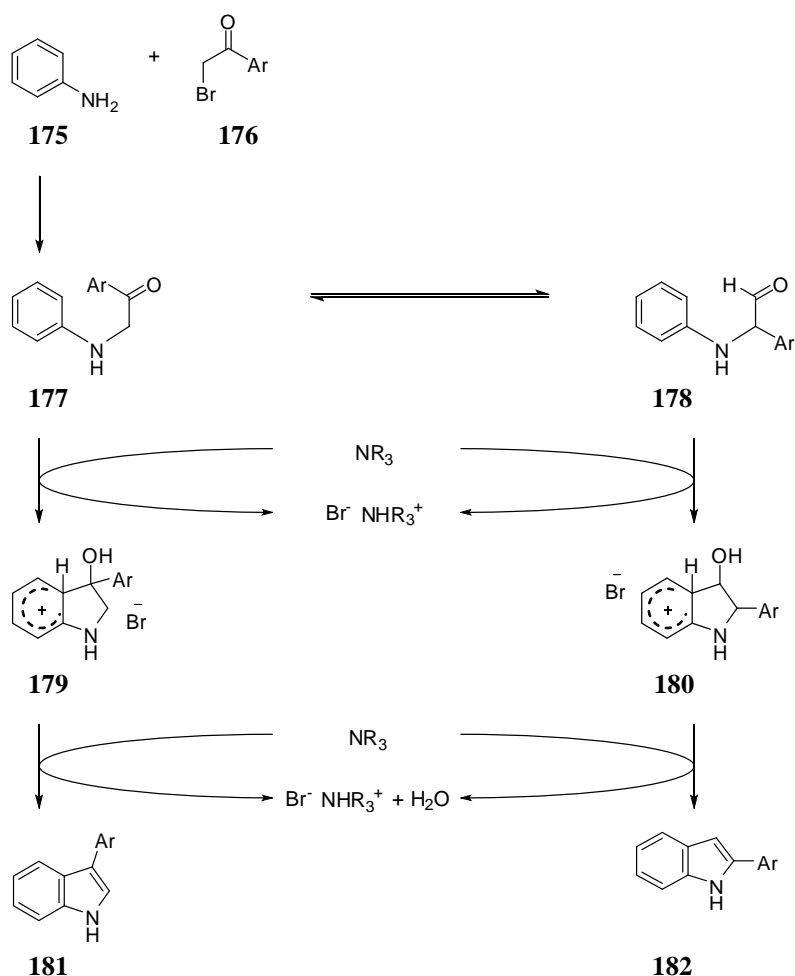


Abbildung 4.30: Mechanismus der Bischler-Indolsynthese in der Mikrowelle. Durch eine Umlagerung der Verbindung 177 zum Aldehyd 178 können sowohl die 3-substituierte Verbindung 181 als auch die 2-substituierte Verbindung 182 entstehen.²⁵⁶

Dabei wurden aromatische Amine mit α -Bromketonen in der Mikrowelle (100 W, 150 °C, 20 psi, 10 min) umgesetzt. Der Mechanismus der Reaktion wurde in dieser Publikation wie in Abbildung 4.30 dargestellt beschrieben. Die Reaktion beginnt mit einer nucleophilen Substitution (S_N2 -Reaktion) zwischen Anilin und dem α -Bromketon. Das entstandene 2-Aminoketon, kann dann direkt zum 3-substituierten Indol-Derivat **181** cyclisieren. Alternativ kann sich Verbindung **177** jedoch auch unter Beteiligung eines weiteren Moleküls Anilin (**175**) zum entsprechenden Aldehyd **178** umlagern und so nach Cyclisierung das 2-substituierte Indol-Derivat **182** bilden. Die Umlagerung findet sowohl unter sauren als auch neutralen Bedingungen statt.

Diese Vorschrift wurde an drei Molekülen getestet. Zunächst wurde 3-Aminopyridin (**183**) mit Ethyl-3-bromoxopropanoat (**184**) umgesetzt.

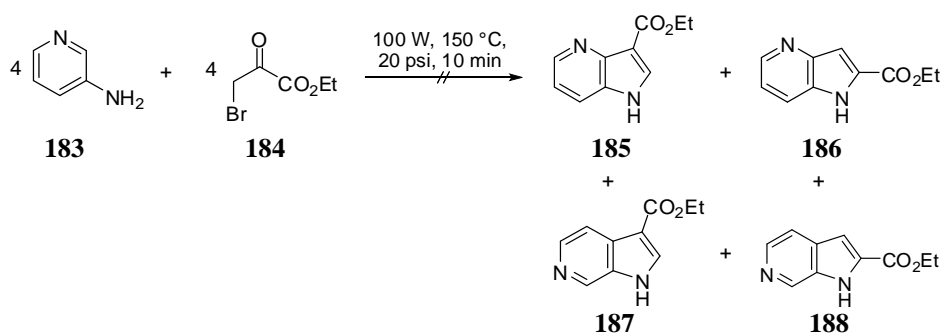


Abbildung 4.31: Die Synthese der Isomerenmischung aus Ethyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-3-carboxylat (**185**), Ethyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-2-carboxylat (**186**), Ethyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-3-carboxylat (**183**) und Ethyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-2-carboxylat (**184**) nach Vara et al.²⁵⁶ führte zu keinem Ergebnis.

Durch die Synthese in der Mikrowelle sollte sich ein Isomerengemisch aus den vier Isomeren Ethyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-3-carboxylat (**185**), Ethyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-2-carboxylat (**186**), Ethyl-1*H*-pyrrolo-[2,3-*c*]pyridin-3-carboxylat (**183**) und Ethyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-2-carboxylat (**184**) bilden. Nach Aufarbeitung der Reaktion konnte jedoch keines der Produkte in der Reaktionsmischung nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, dass die Bedingungen der Mikrowellen-Reaktion nur für Azaindole ungeeignet sind, wurde die Reaktion anschließend noch einmal mit 3,5-Dichloranilin (**99**) unter den publizierten Bedingungen durchgeführt. Außerdem wurde das in der Veröffentlichung verwendet Edukt Anilin (**175**) unter drei verschiedenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Zunächst wurden die publizierten Bedingungen angewendet. Ein zweiter Versuch wurde mit einem Überschuss an Ethyl-3-bromoxopropanoat (**184**) unternommen und bei der dritten Variante wurde das stöchiometrische Verhältnis beibehalten, die Leistung jedoch auf 150 W erhöht. Da auch keine dieser Reaktionen ein Produkt ergab, wurde diese Methode für spätere Experimente nicht mehr berücksichtigt.

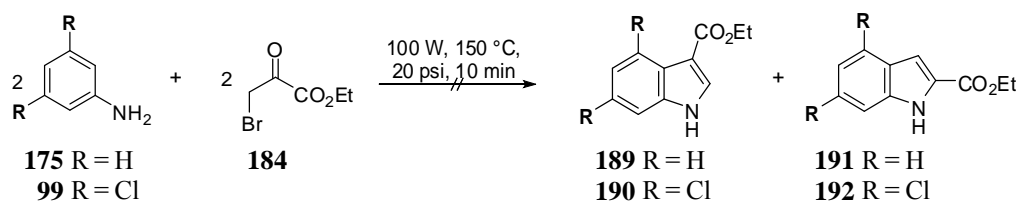


Abbildung 4.32: Die Synthese der Isomerenmischung aus Ethyl-1*H*-indol-3-carboxylat (189) und Ethyl-1*H*-indol-2-carboxylat (191) sowie Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-3-carboxylat (190) und Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (192) nach Vara et al. führte zu keinem Ergebnis.

4.3.3 UNTERSUCHUNGEN AM PYRROLRING DES INDOLS

Untersucht werden sollte weiterhin die Bedeutung der Carboxyalkylgruppe in Position 3. Dazu sollte durch Variation der Alkylreste die sinnvollste Kettenlänge bestimmt werden. Die Verlängerung des Carboxylrestes in Position 3 stand zunächst im Fokus der Untersuchung. Dazu wurde 3,5-Dichloranilin (**99**) nach der Vorschrift von Poriel et al. diazotiert und anschließend mit Ethyl-2-oxo-cyclohexancarboxylat (**193**) zum entsprechenden Hydrazon (**194**) umgesetzt.²⁵⁴ Dieses wurde in Essigsäure gelöst und nach Zugabe von Polyphosphorsäure drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Produkt 3-(4,6-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1*H*-indol-3-yl)butansäure (**195**) wurde zunächst mit Dichlormethan extrahiert und anschließend säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat, 40 : 60) aufgereinigt.

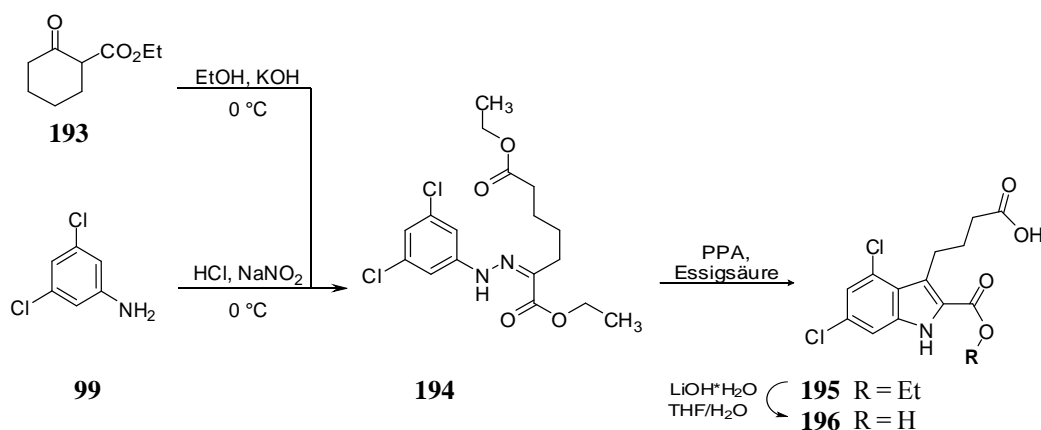


Abbildung 4.33: Darstellung von 3-(4,6-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1*H*-indol-3-yl)butansäure (**195**) und anschließende Verseifung zu 3-(3-Carboxypropyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**196**).

Die Verseifung des Moleküls erfolgte unter Standard-Bedingungen mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in THF/Wasser.²⁵² Das Produkt wurde sowohl in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen als auch in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen getestet, konnte aber in beiden Testsystemen praktisch keine Calciumausschüttung bewirken.¹⁴⁴ Da eine Verlängerung der Kettenlänge in Position 3 um eine Methylengruppe bereits zum vollständigen Verlust der Aktivität führt, wurde

von einer weiteren Verlängerung der Kette abgesehen. Um genauere Aussagen über die Bedeutung der Kettenlänge in Position 3 treffen zu können, ist auch eine Verkürzung der Kette um eine Methylengruppe von Interesse. Bei diesem Produkt ist jedoch eine Reaktion mit einem cyclischen Keton – ähnlich der bisher synthetisierten Verbindungen – nicht möglich, da dazu Ethyl-2-oxocyclobutancarboxylat als Reagenz verwendet werden müsste und dieses nur schwer erwerbbar ist. Eine Möglichkeit der Synthese wäre durch die Verwendung von 4-(Ethoxycarbonyl)-5-oxoheptansäure, welches die entsprechende offenkettige Form des Ketons darstellt. Auch diese ist nicht käuflich erwerbbar und müsste ebenfalls zuerst hergestellt werden. Deshalb wurde stattdessen Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat, bei dem der Propionsäurerest in Position 3 vollständig fehlt, synthetisiert. Einerseits erlaubt diese Verbindung die Überprüfung der Bedeutung dieser funktionellen Gruppe. Andererseits wurde vermutet, dass sich durch eine anschließende Alkylierung ein einfacher Zugang zu neuen Verbindungen bieten könnte. Für die Synthese von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) wurde 3,5-Dichloranilin (**99**) nach der Vorschrift von Poriel et al. diazotiert und anschließend mit Ethyl-2-methylacetoacetat (**197**) zum entsprechenden Hydrazon (**198**) umgesetzt.²⁵⁴ Dieses wurde mit Polyphosphorsäure in Toluol cyclisiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat, 90 : 10) aufgereinigt.

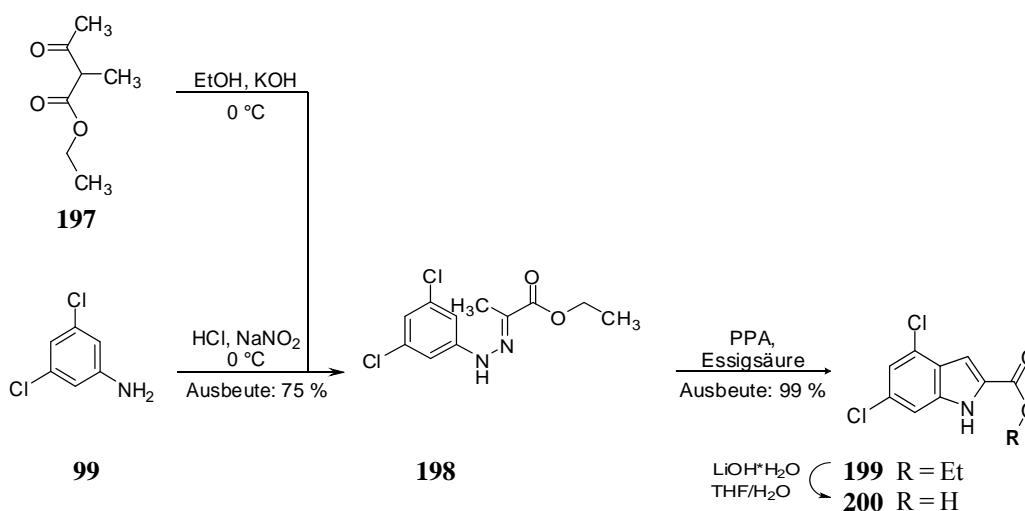


Abbildung 4.34: Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) und anschließende Verseifung zu 4,6-Dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**200**).

Die Verseifung des Moleküls erfolgte unter Standard-Bedingungen mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in THF/Wasser.²⁵² Das Produkt (**200**) wurde sowohl in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen als auch in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen getestet, konnte aber in beiden Testsystemen keine Calciumfreisetzung bewirken.¹⁴⁴ Die Entfernung der 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe führte also zu einem vollständigen Aktivitätsverlust dieser Verbindung.

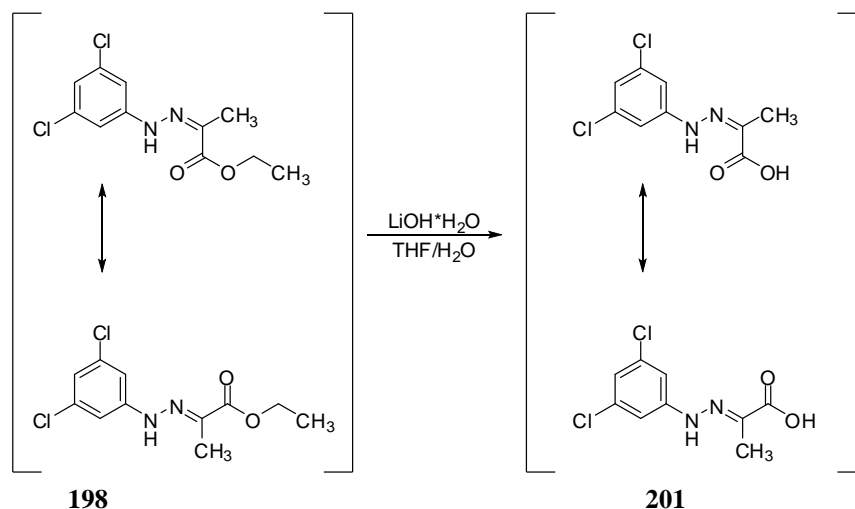


Abbildung 4.35: Darstellung von 2-(2-(3,5-dichlorphenyl)hydrazono)propan-säure (201).

Auch das (*E,Z*)-Diastereomerengemisch **198** wurde unter Standard-Bedingungen verseift (siehe Abbildung 4.35)²⁵² und an beiden Zellsystemen im Calcium-Assay untersucht. Eine Aktivität konnte auch hier nicht festgestellt werden.¹⁴⁴

Für die Einführung eines 1-Carboxymethyl-Restes in Position 3 des Indols wurde Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) nach der Vorschrift von Gray et al. mit Ethyl-3-iodacetat (**203**) in Gegenwart von Kaliumcarbonat umgesetzt (siehe Abbildung 4.36).²⁵⁷

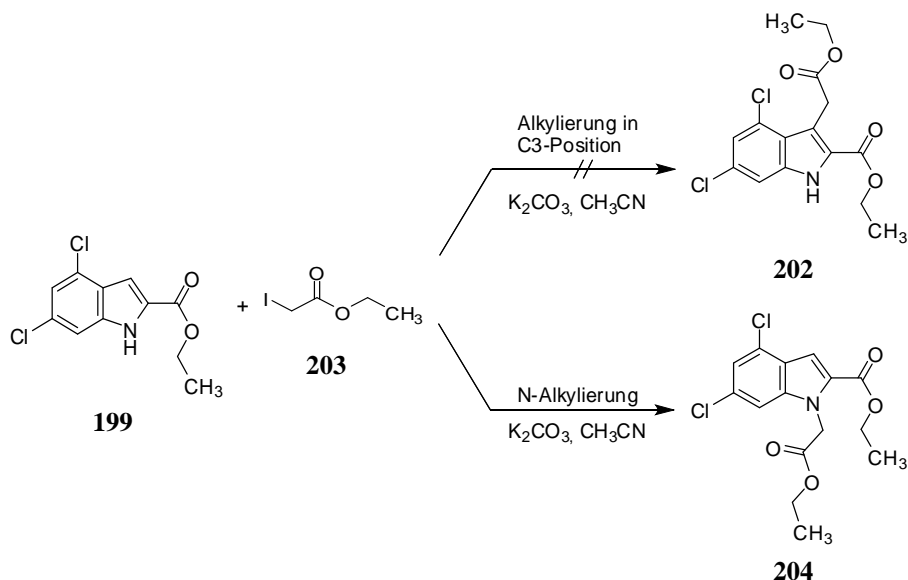


Abbildung 4.36: Eine Alkylierung von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) mit Ethyl-3-iodacetat (**203**) führt selektiv zu einer N-Alkylierung.

Bei der Synthese sah es zunächst so aus, als ob das Produkt (**202**) entstanden sei. Eine genaue analytische Untersuchung der Verbindung mittels verschiedener NMR-Techniken ergab jedoch,

dass es sich bei der entstandenen Verbindung nicht um das gewünschte Produkt handelt, sondern um die N-alkylierte Verbindung Ethyl-4,6-dichlor-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**204**). Dies ist vor allem in einem Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum der Verbindung gut erkennbar. Detektiert wurden drei aromatische Wasserstoffatome. Das HSQC-Spektrum beweist, dass diese Wasserstoffe jeweils zu einer aromatischen CH-Gruppe gehören. Dies ist nur für Verbindung **204** möglich. Außerdem erkennt man im COSY-Spektrum der Verbindung eine Kopplung der aromatischen Wasserstoffatome zueinander. Damit handelt es sich eindeutig um Verbindung **204** und nicht wie von Gray et al. publiziert um Verbindung **202**. Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit Méroux et al., die ebenfalls eine N-Alkylierung unter diesen Bedingungen beobachteten.²⁵⁸

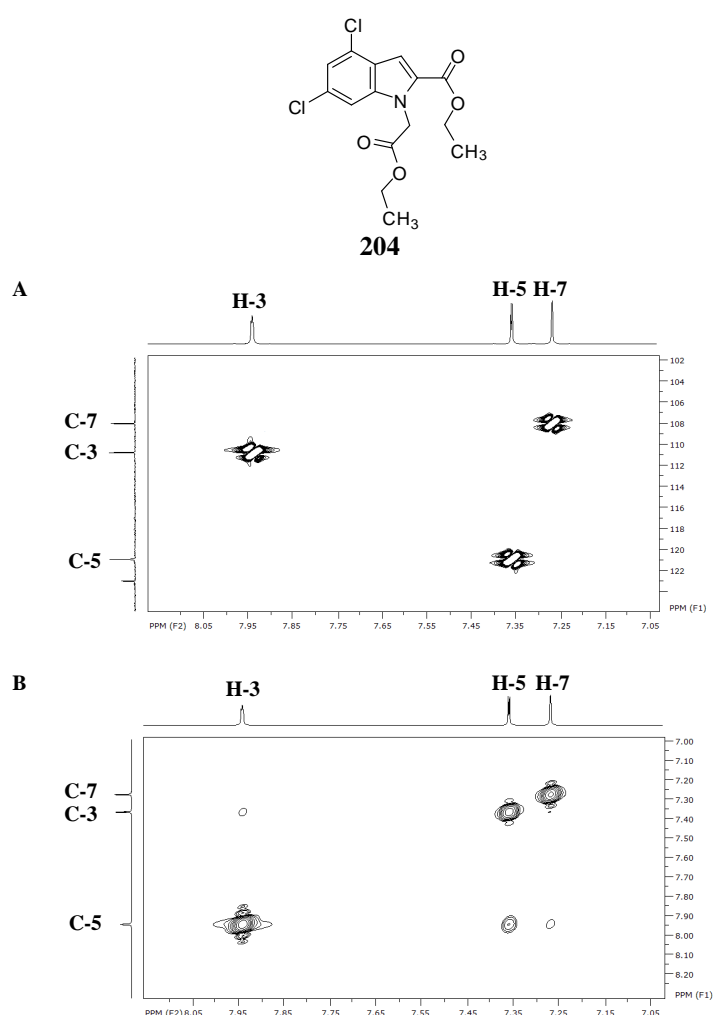


Abbildung 4.37: Strukturformel und NMR-Spektroskopie von Verbindungen 204. A) Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum. B) Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum.

Die Verseifung von Verbindung **204** durch Zusatz von Lithiumhydroxid-Monohydrat in THF/Wasser ergab Verbindung **205**.²⁵²

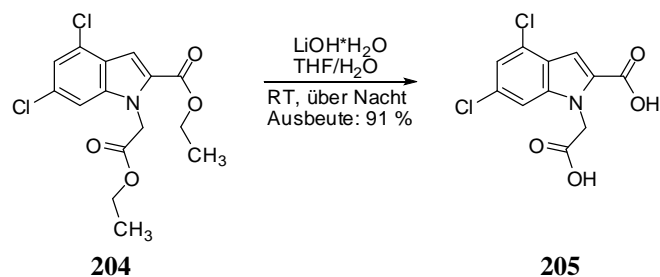


Abbildung 4.38: Darstellung von 1-(Carboxymethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**205**).

Im Calcium-Assay war auch diese Verbindung in beiden getesteten Zellsystemen inaktiv.¹⁴⁴ Der Verlust der 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe in Position 3 kann folglich nicht durch die Einführung einer 1-Carboxymethyl-Gruppe in Position 1 kompensiert werden. Die besondere Bedeutung der 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe in Position 3 wird durch diese Erkenntnisse weiter hervorgehoben. Um eine Alkylierung in Position 3 dennoch zu ermöglichen, wurde anschließend versucht, Position 1 des Indols zunächst zu schützen und anschließend erneut zu alkylieren. Als Schutzgruppe wurde die gängige *tert*-Butyl-oxycarbonyl-Schutzgruppe (BOC) verwendet. Zur Schützung wurde Di-*tert*-butyl-dicarbonat (BOC₂O) tropfenweise zu einer gerührten Mischung aus Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) und Cäsiumfluorid in DMF gegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in Wasser gegossen. Das Rohprodukt (**207**) wurde mit Ethylacetat extrahiert und säulenchromatographisch (Petrol-ether : Ethylacetat, 90 : 10) aufgereinigt (siehe Abbildung 4.39).²⁵⁹

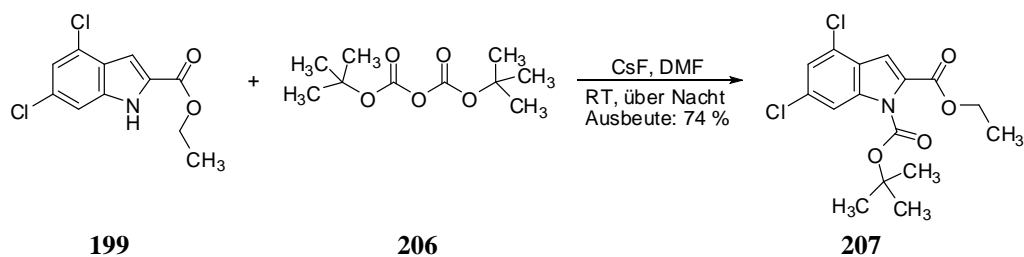


Abbildung 4.39: Darstellung von 1-*tert*-Butyl-2-ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-1,2-dicarboxylat (**207**).

Verbindung **207** wurde anschließend nach Vorschrift von Gray et al. mit Ethyl-3-iodacetat (**203**) in Gegenwart von Kaliumcarbonat umgesetzt. Als Produkt konnte jedoch auch hier nur die N-alkylierte Verbindung **204** isoliert werden (siehe Abbildung 4.40). Das ¹³C-DEPT-Spektrum von Verbindungen **204** zeigt deutlich, dass es zu einer Abspaltung der BOC-Schutzgruppe gekommen ist.

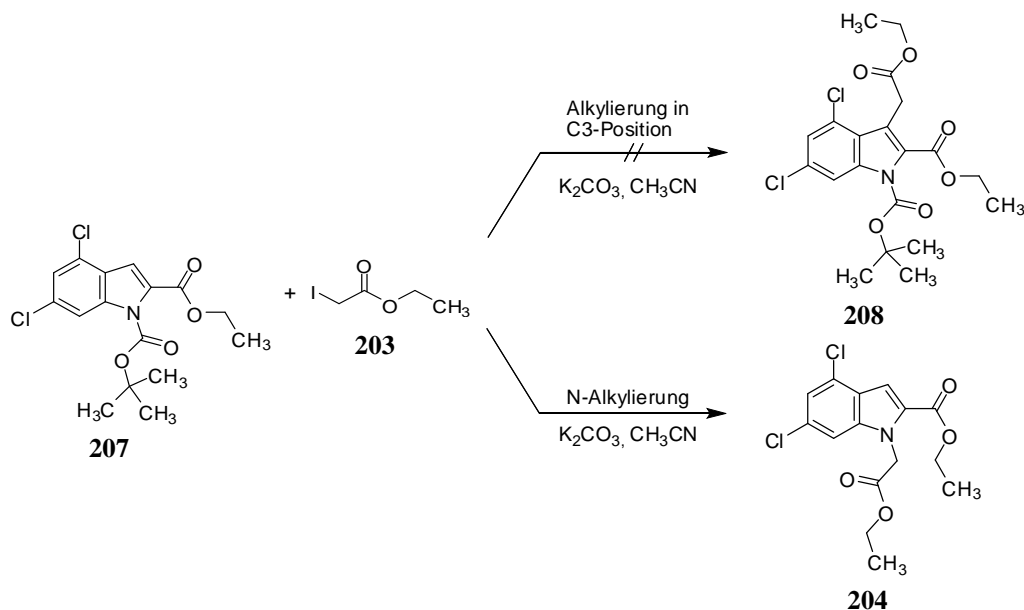


Abbildung 4.40: Eine Alkylierung des BOC-geschützten Ethyl-4,6-dichlor-1H-indol-2-carboxylats (**207**) mit Ethyl-3-iodoacetat (**203**) führt selektiv zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe und anschließender N-Alkylierung.

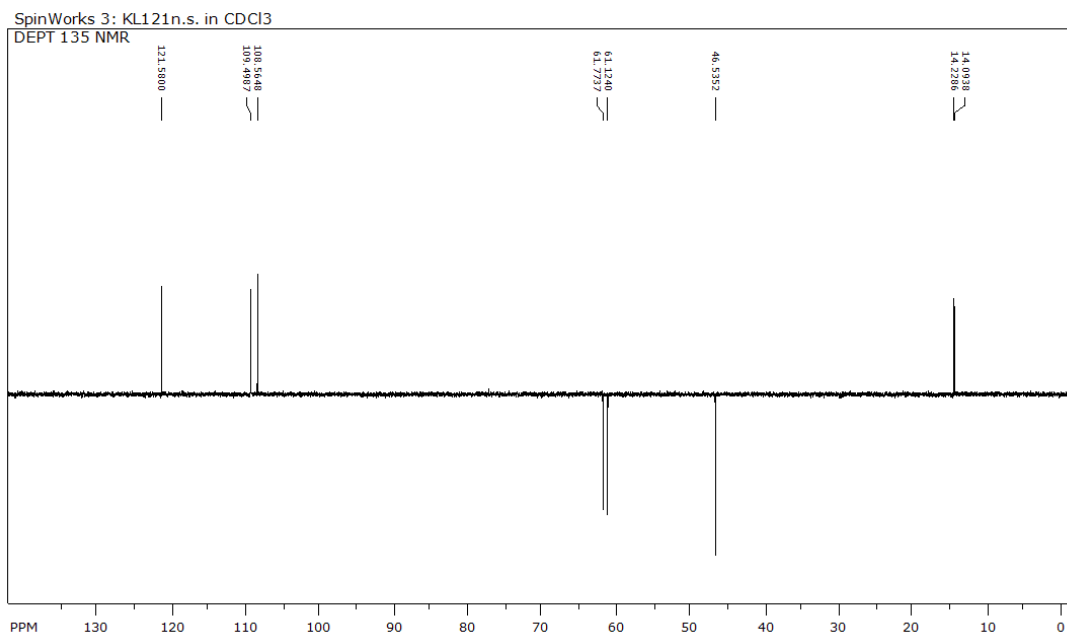


Abbildung 4.41: Das ¹³C-DEPT-Spektrum von Verbindungen **204** zeigt deutlich, dass es zu einer Abspaltung der BOC-Schutzgruppe gekommen ist. Die Signale zwischen 14 und 62 ppm können der Esterfunktion in Position 2 sowie dem neu eingeführten 1-Ethyl-1-oxoethyl-Rest zugeordnet werden. Eine Verknüpfung in C3-Position kann durch die Anwesenheit von drei aromatischen CH-Gruppen ausgeschlossen werden.

Die Signale zwischen 14 und 62 ppm können der Esterfunktion in Position 2 sowie der neu eingeführten 1-Ethyl-1-oxoethyl-Restes zugeordnet werden. Eine Verknüpfung in C3-Position kann

durch die Anwesenheit von drei aromatischen CH-Gruppen ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 4.41).

Nachfolgend wurde versucht, die Reaktionsbedingungen durch Reduktion der Temperatur so anzupassen, dass die Schutzgruppe erhalten bleibt und die Alkylierung an C3-Position erfolgt. Bei dieser Reaktion konnte jedoch keine Umsetzung mehr erreicht werden. Eine nachträgliche Alkylierung in Position C3 ist ausgehend von Verbindung **199** also nicht möglich.

Verbindung **199** bot außerdem die Möglichkeit weiterer Variationen in C3-Position des Indols. Zunächst wurde Ethyl-4,6-dichlor-3-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-enyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**209**), welches in Position 3 mit der ungesättigten 3-Ethoxy-3-oxoprop-1-enyl-Gruppe substituiert ist, synthetisiert.

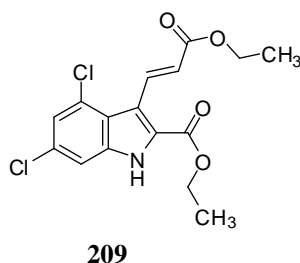


Abbildung 4.42: Ethyl-4,6-dichlor-3-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-enyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**209**)

Dafür wurde mit einer Vilsmeier-Haack-Formylierung zunächst das 3-Formylindol (**210**) hergestellt (siehe Abbildung 4.43).²⁶⁰ Verbindung **199** wurde dazu in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und langsam mit *N,N*-Dimethylformamid und frisch destilliertem Phosphorylchlorid versetzt.

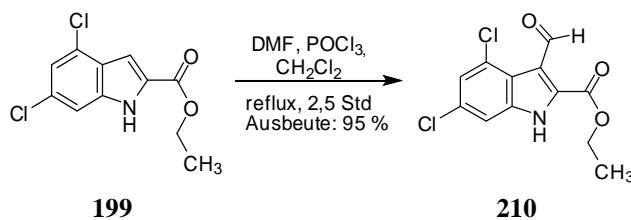


Abbildung 4.43: Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-3-formyl-1*H*-indol-2-carboxylat (**210**) durch Vilsmeier-Haack-Formylierung von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**).²⁶⁰

Die Mischung wurde zweieinhalb Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und sparsam mit kaltem Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde dann mit 1 M Natriumacetat-Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und erneut mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag 16 h im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt (**210**) wurde anschließend in einer

Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit Ethyl-(triphenylphosphoranyliden)acetat (**211**) zum Alken (**209**) umgesetzt (siehe Abbildung 4.44).²⁵³

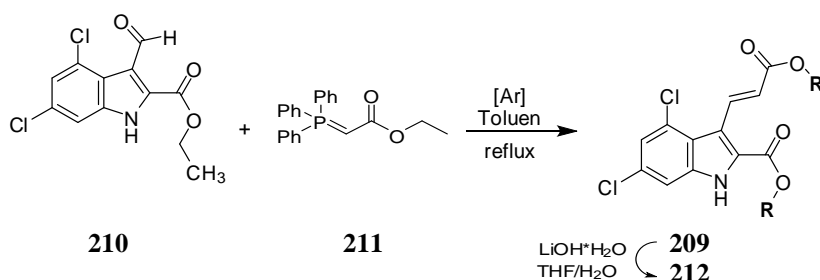


Abbildung 4.44: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zur Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-3-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-enyl)-1H-indol-2-carboxylat (209**)²⁵³ und anschließende Verseifung zu 3-(2-Carboxyvinyl)-4,6-dichlor-1H-indol-2-carbonsäure (**212**).²⁵²**

Da das Produkt trotz Säulenchromatographie und Umkristallisation nur in einer Reinheit von 87 % erhalten werden konnte, wurde es in dieser Reinheit ohne weitere Analytik weiterverwendet. Die Verseifung erfolgte unter Standard-Bedingungen mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in THF/Wasser (siehe Abbildung 4.44).²⁵²

Die durch Verbindung **212** ausgelöste Calciumfreisetzung wurde in beiden Testsystemen bestimmt. Während die Verbindung in 1321N1-GPR17-Zellen keine Aktivität besitzt, ist sie mit einem EC₅₀ von $1.59 \pm 0.34 \mu\text{M}$ in CHO-GPR17-Zellen schwach aktiv (siehe Abbildung 4.45).¹⁴⁴

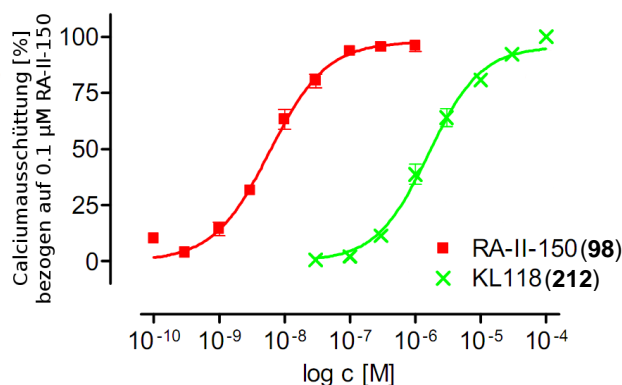


Abbildung 4.45: Konzentrationsabhängige Calciumausschüttung in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ausgelöst durch Verbindung **212 (KL118) im Vergleich zu Verbindung **98** (RA-II-150); modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴**

Verbindung **212** wurde als Edukt für die Herstellung eines Radioliganden verwendet. Hierfür wurde **212** einer katalytischen Hydrierung mit gasförmigem ³H₂ unterworfen (Auftragsmarkierung durch die Fa. Quotient Bioscience; UK).

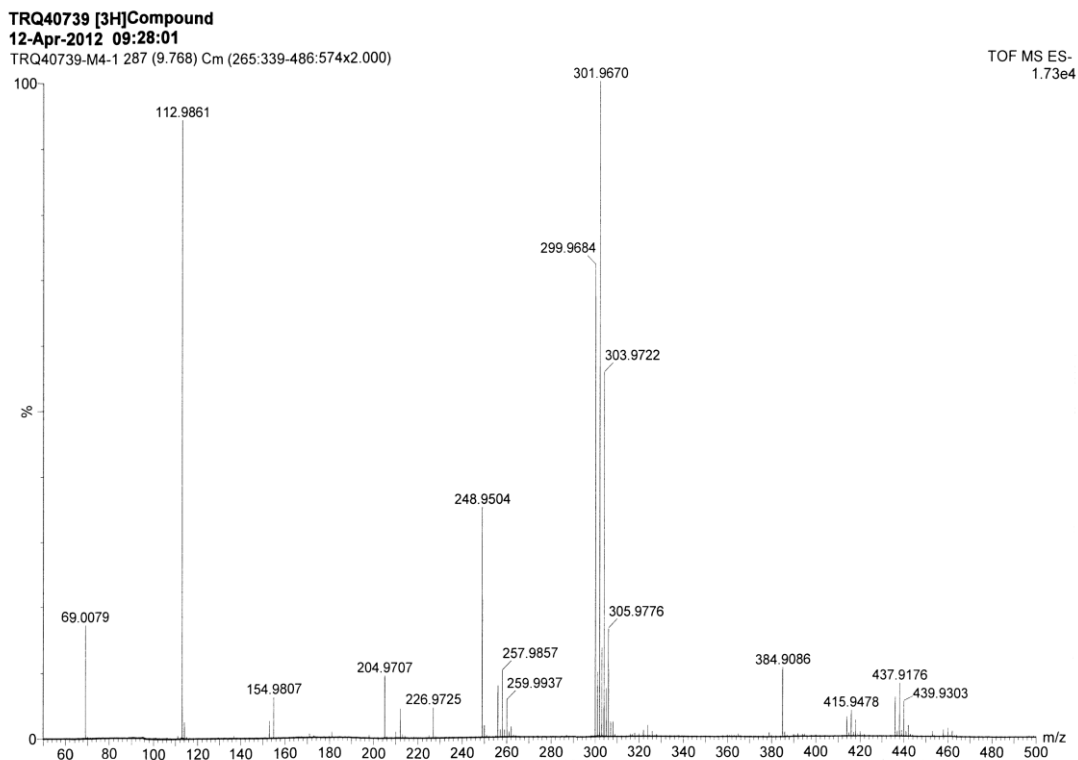


Abbildung 4.46: Massenspektrometrische Analyse von Verbindung 213.

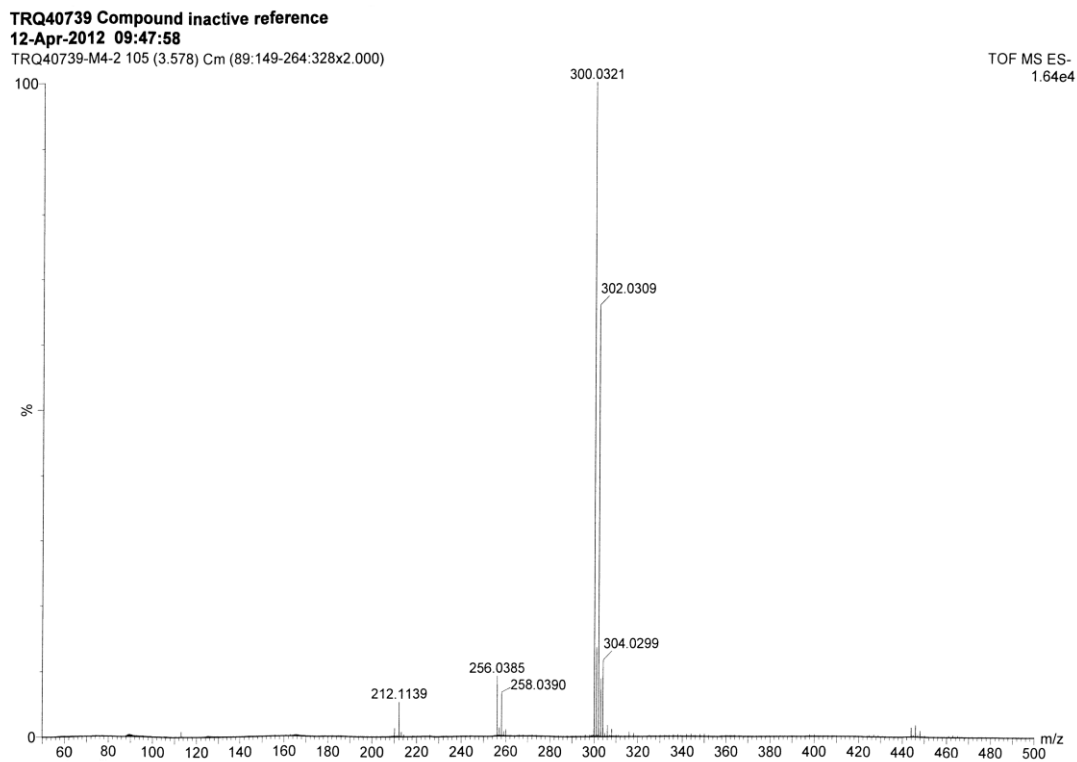


Abbildung 4.47: Massenspektrometrische Analyse der Vergleichssubstanz 98.

Als Katalysator dieser Reaktion wurde Palladium auf Aktivkohle verwendet. Als Lösungsmittel diente Ethanol oder Tetrahydrofuran. Der Einbau der Tritiumatome wurde massenspektrometrisch kontrolliert (siehe Abbildung 4.46 und Abbildung 4.47). Das resultierende Produkt **213** (siehe Abbildung 4.49) wies erwartungsgemäß ein um 2 g/mol höheres Molekulargewicht auf als die ebenfalls untersuchte Referenzsubstanz **98**.

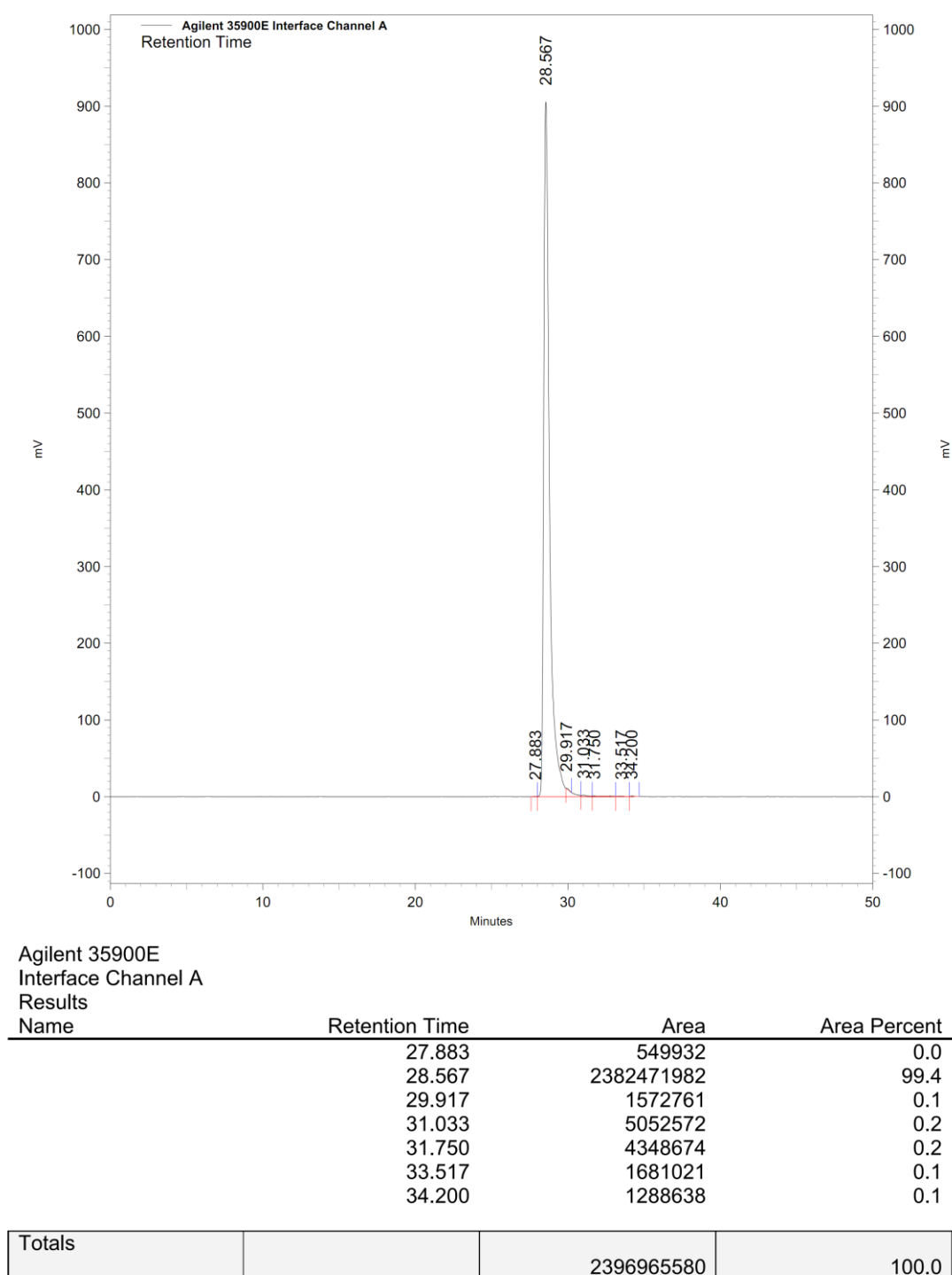


Abbildung 4.48: HPLC-MS-Analyse von Verbindung 213.

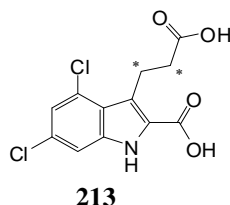


Abbildung 4.49: [^3H]-3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (213).

Verbindung **213** konnte mit mäßiger spezifischer Aktivität (17 Ci/mmol = 629 GBq/mmol) in einer radiochemischen Reinheit von 99,4 % erhalten werden (siehe Abbildung 4.48). Die relativ geringe spezifische Aktivität des Radioliganden kann vermutlich mit einer Enolisierung erklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation des Indols war die Einführung einer Methyl-2-(methylamino)acetat-Gruppe in Position 3. Diese Reaktion wurde zunächst an Indol-3-carbaldehyd (**214**) auf Durchführbarkeit und Reaktionsbedingungen getestet. Dafür wurde der Aldehyd mit Glycinmethylester-Hydrochlorid (**215**) und Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel in Methanol umgesetzt (siehe Abbildung 4.50). Nachdem diese Reaktion erfolgreich verlaufen war, wurde schließlich Ethyl-4,6-dichlor-3-formyl-1*H*-indol-2-carboxylat (**210**) als Edukt verwendet. Man erhielt eine 8 : 1 - Mischung aus dem Methyl-Ethyl-Diester Ethyl-4,6-dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**217**) und dem Ethylester 2-((4,6-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1*H*-indol-3-yl)methylamino)essigsäure. Da die anschließende Verseifung beider Verbindungen zu 3-((Carboxymethylamino)methyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**218**) führt, wurden diese Verbindungen nicht getrennt, sondern gemeinsam verseift (siehe Abbildung 4.50). Verbindung **218** konnte Zellsystem-unabhängig keine Calciumfreisetzung bewirken.

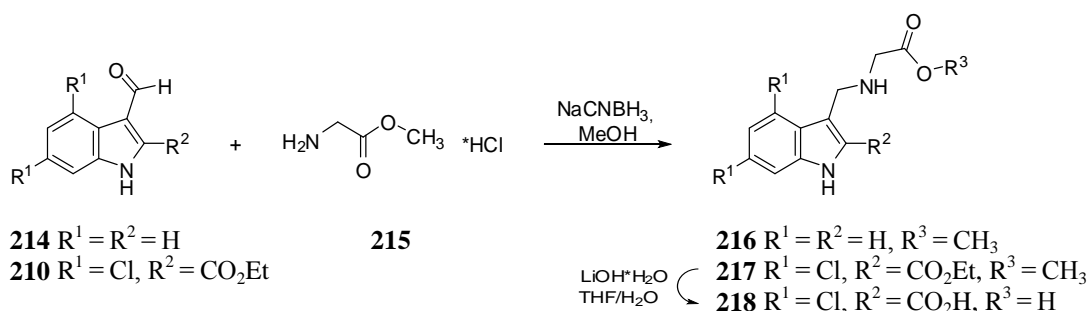


Abbildung 4.50: Darstellung von Methyl-2-((1*H*-indol-3-yl)methylamino)acetat (216) bzw. Ethyl-4,6-dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (217) und anschließende Verseifung zu 3-((Carboxymethylamino)methyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (218).

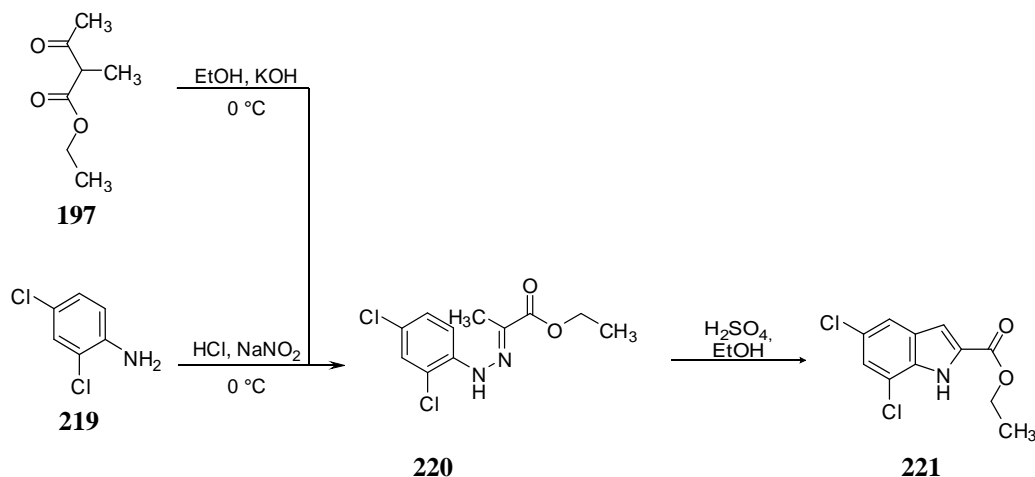


Abbildung 4.51: Darstellung von Ethyl-5,7-dichlor-1H-indol-2-carboxylat (**221**).

Des Weiteren wurde Ethyl-5,7-dichlor-1H-indol-2-carboxylat (**221**) synthetisiert (siehe Abbildung 4.51). Für die Synthese wurde 2,4-Dichloranilin (**219**) nach der Vorschrift von Poriel et al. diazotiert und anschließend mit Ethyl-2-methylacetoacetat (**197**) zum entsprechenden Hydrazone (**220**) umgesetzt.²⁵⁴ Dieses wurde mit konzentrierter Schwefelsäure in Ethanol über Nacht unter refluxierenden Bedingungen gerührt.²⁵² Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurde die Mischung mit Wasser verdünnt. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat, 90 : 10). Die erhaltene Verbindung sollte als Ausgangsmaterial für die Synthese von 1-(2-Carboxyethyl)-5,7-dichlor-1H-indol-2-carbonsäure (**222**), welches eine spiegelbildliche Variante der Leitstruktur (**98**) darstellt (siehe Abbildung 4.52), dienen. Die räumliche Anordnung der einzelnen Funktionen dieser Struktur (Chloratome, Propionsäurerest, Ameisensäurerest) bleibt in Verbindung **222** erhalten.

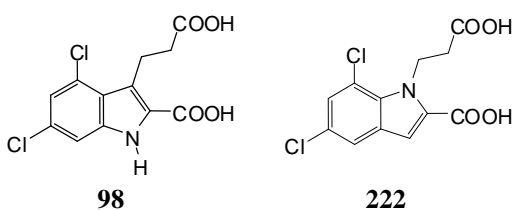


Abbildung 4.52: Verbindung **222** stellt eine spiegelbildliche Variante der Leitstruktur **98** dar.

Einzig die NH-Funktion ist in dieser Struktur nicht mehr vorhanden. Damit könnte man Aufschluss erhalten, ob ausschließlich die korrekte Anordnung der Chlor-Substituenten und der beiden Carbonsäurefunktionen eine Bindung am GPR17 hervorrufen, oder ob auch die sekundäre Amin-Funktion, z. B. durch Wasserstoffbrücken-Bildung, an der Bindung essentiell beteiligt ist. Zur Synthese wurde zunächst Ethyl-5,7-dichlor-1H-indol-2-carboxylat (**221**) nach der Vorschrift

von Gray et al. mit Ethyl-3-brompropionat in Gegenwart von Kaliumcarbonat in DMF umgesetzt (siehe Abbildung 4.53).²⁵⁷

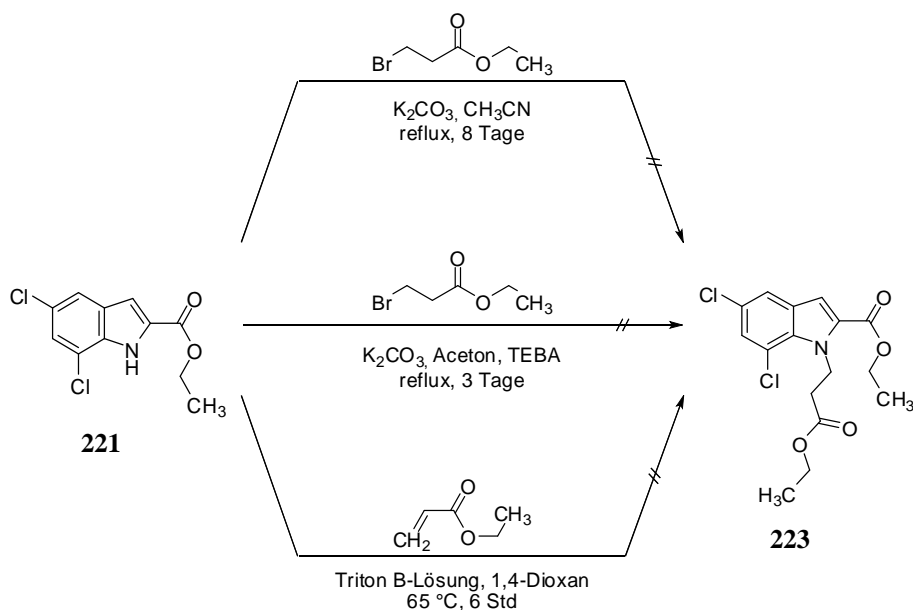


Abbildung 4.53: Die Darstellung von Ethyl-5,7-dichlor-1-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**223**) führte mit keiner der drei getesteten Methoden zu einem Ergebnis.

Wie zuvor beschrieben, führten diese Reaktionsbedingungen bei der Synthese von Verbindung **204** selektiv zu einer N-Alkylierung. Bei der Umsetzung von **221** konnte jedoch auch nach mehreren Tagen unter refluxierenden Bedingungen und unter Zugabe von weiteren Äquivalenten Kaliumcarbonat und Ethyl-3-brompropionat keine Umsetzung erzielt werden. Deshalb wurde diese Reaktion unter den Bedingungen von Kiéc-Kononowicz et al. erneut durchgeführt (siehe Abbildung 4.53).²⁶¹ Dazu wurde Verbindung **221** mit Kaliumcarbonat und Triethylbenzylammoniumchlorid (TEBA) als Phasentransferkatalysator in Aceton unter Rückfluss erhitzt und Ethyl-3-brompropionat tropfenweise zugefügt. Die Suspension wurde anschließend drei Tage unter Rückfluss erhitzt. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine N-Alkylierung beobachtet werden. Schließlich wurde versucht Ethyl-5,7-dichlor-1-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**223**) nach der Vorschrift von Kitano et al. in einer Michael-Addition zu synthetisieren (siehe Abbildung 4.53). Dazu wurde eine Mischung aus Ethyl-5,7-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**221**), Ethylacrylat und einer 40 %igen Lösung aus Benzyltrimethylammoniumhydroxid in Methanol (Triton B) in 1,4-Dioxan sechs Stunden bei 65 °C gerührt. Triton B dient dabei sowohl als Base als auch als Phasentransferkatalysator. Die Mischung wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und zu einer Mischung aus Essigsäure und 30 %iger Schwefelsäure gegeben. Nach 2,5 h bei 75 °C wurde tropfenweise Wasser hinzugegeben. Durch Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie konnte jedoch zu keiner Zeit eine

Umsetzung des Edukts beobachtet werden. Mit den drei durchgeführten Alkylierungsversuchen konnte somit keine N-Alkylierung von Ethyl-5,7-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**221**) erreicht werden. Dies ist insofern bemerkenswert, als die Alkylierung von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**204**), welches sich ausschließlich im Chlorsubstitutionsmuster von Verbindung **221** unterscheidet, selektiv immer zu einer N-Alkylierung führte. Weitere Versuche eine N-Alkylierung von Verbindung **221** zu erreichen, wurden anschließend von Frau Anne Männle im Rahmen ihrer Masterarbeit in unserem Arbeitskreis fortgesetzt.

4.4 STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen konnten einige interessante Erkenntnisse hinsichtlich der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Indol-Derivaten am GPR17 gewonnen werden. Die von Dr. Rhalid Akkari begonnenen und im Rahmen dieser Arbeit fortgesetzten Synthesen zeigen einerseits die besondere Bedeutung des Chlor-Substituenten in Position 6 im Vergleich zu dem in Position 4. Während die 6-chlorierte Verbindung **129** nur geringfügig schwächer aktiv ist als die Leitstruktur (**98**), ist die 4-chlorierte Verbindung **130** am GPR17 in beiden getesteten Zellsystemen nur schwach aktiv. Trotzdem scheint eine Substitution mit beiden Chlor-Substituenten bevorzugt. Weitergehende Untersuchungen zum favorisierten Substitutionsmuster am Phenylring konnten mit der Synthese der Chlor-substituierten Indol-Derivate 3-(2-Carboxyethyl)-7-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**139**) bzw. 3-(2-Carboxyethyl)-4,7-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**140**) erreicht werden. Beide Verbindungen führen nur im CHO-Zellsystem zu einer geringen Aktivierung des GPR17-Rezeptors (siehe Abbildung 4.12). Auch diese Ergebnisse bestätigen die besondere Bedeutung der Position 6 für agonistische GPR17-Liganden. Auffällig ist, dass 7-substituierte Verbindungen offenbar Partialagonisten am GPR17-Rezeptor sind. Alle anderen synthetisierten Indol-Derivate wirken am GPR17-Rezeptor als Vollagonisten. Durch die Verwendung von 1-Naphthylamin als Edukt konnte weiterhin 3-(2-Carboxyethyl)-1*H*-benzo[*g*]indol-2-carbonsäure (**144**) hergestellt werden, welches eine - im Vergleich zur Leitstruktur - um einen Aromaten erweiterte Struktur darstellt. Obwohl die Verbindung sterisch wesentlich anspruchsvoller ist als die Leitstruktur, konnte ein EC₅₀-Wert von $18.1 \pm 6.9 \mu\text{M}$ im CHO-GPR17-Zellsystem und somit eine schwache Aktivität am GPR17-Rezeptor nachgewiesen werden. Um den Einfluss der Elektronendichte, der Elektronegativität und der Größe der Substituenten zu überprüfen, wurden außerdem weitere Indol-Derivate, die in 4- und/oder 6-Position substituiert waren, hergestellt. Das Difluor-Derivat 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-difluor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**148**) war in der Lage, den GPR17-Rezeptor in beiden getesteten Systemen zu aktivieren. Der EC₅₀ lag mit $8.10 \pm 2.26 \mu\text{M}$ in 1321N1-Astrocytom-Zellen und $0.17 \pm 0.04 \mu\text{M}$ in CHO-Zellen jedoch nur im niedrigen mikromolaren bis hohen nanomolaren Bereich. Verbin-

dung **148** wurde darüber hinaus im IP_3 -Assay getestet. Der EC_{50} -Wert von Verbindung **148** wurde ausschließlich im CHO-Zellsystem bestimmt und betrug $21.9 \pm 8.4 \mu\text{M}$.¹⁴⁴ Schließlich wurde die Aktivierung des Rezeptors durch Verbindung **148** in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen mittels dynamischer Massen-Umverteilung gemessen. Der EC_{50} -Wert betrug $9.33 \pm 10.5 \mu\text{M}$.¹⁴⁴ Sowohl im IP_3 -Assay als auch im DMR-Assay ist die Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu der im Calcium-Assay bestimmten nach rechts verschoben. Im Gegensatz dazu wurde anschließend ein weiterer Halogenaustausch der Chloratome gegen das größere und weniger elektronegative Brom durchgeführt. Die resultierende Verbindung **174** ist in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen etwa 4–5fach aktiver als die bisherige Leitstruktur (**98**). In rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ist das Dibrom-Derivat mit einem EC_{50} -Wert von $15.0 \pm 4.3 \text{ nM}$ in einer ähnlichen Größenordnung aktiv wie die Leitstruktur (**98**).¹⁴⁴ Verbindungen mit großen, gering elektronegativen Resten scheinen am GPR17-Rezeptor also besonders aktiv zu sein. Weiterhin sollten die beiden Isomere des Monotrifluor-Derivates Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat und Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-6-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat hergestellt werden. Die Analyse des Produktes mittels verschiedener NMR-Techniken zeigte jedoch, dass nur Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**150**) erhalten worden war. Ähnlich wie das 4-Chlorindol-Derivat (**130**) war auch Verbindung **152** nicht in der Lage, den GPR17-Rezeptor in CHO-Zellen zu aktivieren. Die besondere Bedeutung der Position 6 des Aromaten wird auch hier wieder deutlich. Die Synthese der beiden Monofluor-Verbindungen ergaben unbeabsichtigt die Bildung der Amide Ethyl-6-fluor-3-(3-(3-fluorphenylamino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**158a**) und Ethyl-4-fluor-3-(3-(3-fluorphenyl-amino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**158b**). Wie erwartet, waren die Verbindungen am GPR17-Rezeptor nicht aktiv. Außerdem wurde festgestellt, dass die noch nicht cyclisierten Vorstufen der Indole inaktiv sind.

In weiteren Experimenten konnte die Bedeutung der 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe nachgewiesen werden. Fehlt diese Gruppe im Molekül (Verbindung **200**), ist die Verbindung vollständig inaktiv. Auch ihr Austausch gegen einen 3-(3-Carboxypropyl)-Rest (Verbindung **196**) führt zu einem vollständigen Funktionsverlust der Verbindung. Der Ersatz gegen eine 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe reduziert die Aktivität in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen und bewirkt Inaktivität in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen. Darüber hinaus kann eine 1-Carboxymethylgruppe in N1-Position das Fehlen der 3-(2-Carboxyethylgruppe) nicht kompensieren. 1-(Carboxymethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**205**) ist in beiden Zellsystemen inaktiv.

Eine Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Indolen am humanen GPR17-Rezeptor ist in Abbildung 4.54 dargestellt.

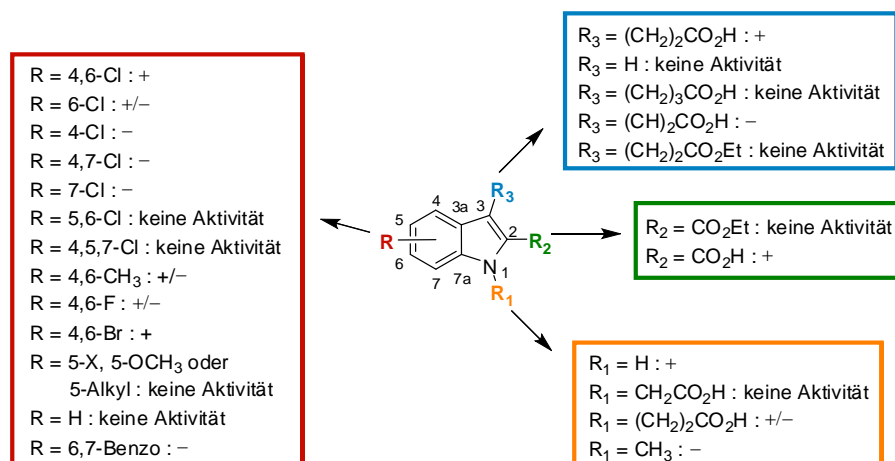


Abbildung 4.54: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Indol-Derivate am GPR17-Rezeptor; + = wird sehr gut toleriert; +/- = führt zu einer leichten Reduktion der Aktivität; - = führt zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität.

Alle Indol-Derivate und die dazugehörigen Testergebnisse sind in Tabelle 10-1, Tabelle 10-2 und Tabelle 10-3 im Anhang zusammengefasst.

4.5 SYNTHESE VON PURIN-ANALOGA

Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**98**) sollte neben den Indol-Derivaten weiterhin auch das Xanthin-Derivat 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**) hergestellt werden.

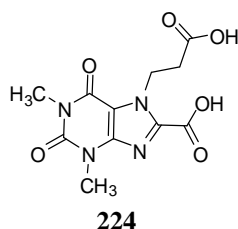


Abbildung 4.55: Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (98**) könnte 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**) ebenfalls als GPR17-Agonist wirksam sein.**

Als Ausgangsmaterial für den Aufbau des Xanthinringes wurde 1,3-Dimethyl-5,6-diaminouracil (**227**) verwendet (siehe Abbildung 4.56). Verbindung **227** ist leicht aus dem kommerziell erhältlichen 1,3-Dimethyl-6-aminouracil (**225**) durch Nitrosierung mit Natriumnitrit in 50 %iger Essigsäure und anschließender Reduktion mit Natriumdithionit in 14,5 %igem Ammoniumhydroxid zugänglich (siehe Abbildung 4.56).²⁶²

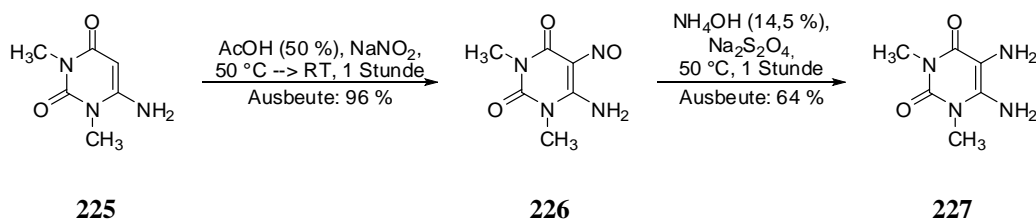
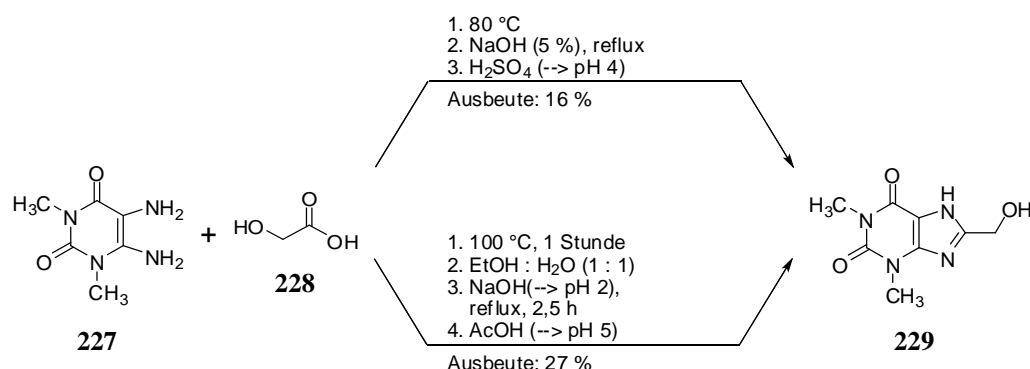
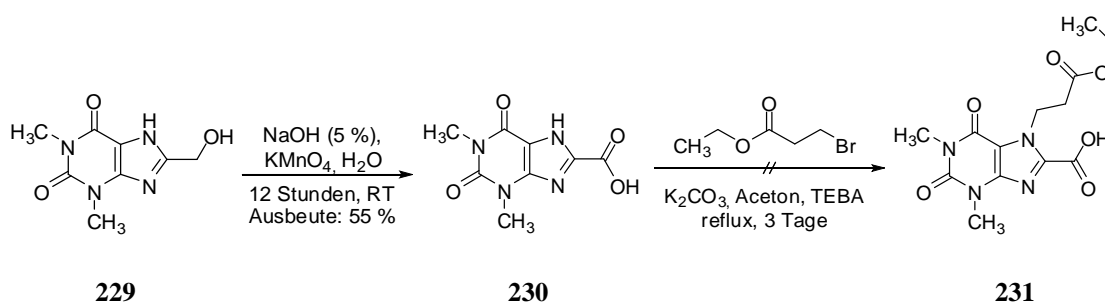


Abbildung 4.56: Darstellung von 5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (227)

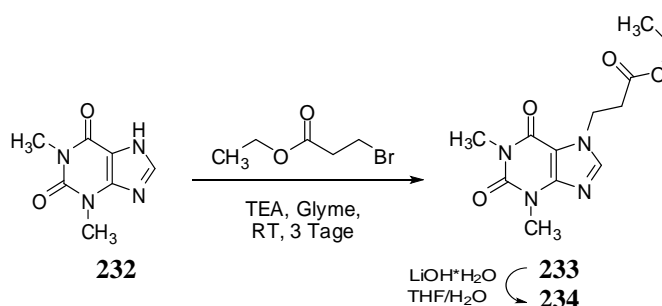
Durch Kondensation und Ringschlussreaktion mit α -Hydroxymethylessigsäure wurde 8-Hydroxymethyltheophyllin (229) erhalten. Diese Reaktion wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Einerseits wurde nach Brederick et al.²⁶³ 5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (227) mit Glycolsäure verrieben, bei 80 °C geschmolzen und anschließend unter Rückfluss mit 5 %iger Natriumhydroxid-Lösung erhitzt. Durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure wurde die Lösung dann auf pH 4 eingestellt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt.²⁶³ Andererseits wurde nach Vorschrift von Baraldi et al.²⁶⁴ eine Mischung aus 5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (227) und Glycolsäure bei 100 °C für eine Stunde gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde eine Lösung aus Ethanol und Wasser (1 : 1) zugefügt, gefolgt von tropfenweiser Zugabe von Natronlauge, bis der pH-Wert der Lösung 12 erreichte. Die resultierende Lösung wurde zweieinhalb Stunden unter Rückfluss erhitzt, auf Raumtemperatur gekühlt und langsam mit Essigsäure auf pH 5 angesäuert. Bei Lagerung im Kühlschrank (5 °C) fiel das Produkt aus. Dieses wurde abfiltriert und aus Ethanol : Wasser (1 : 1) umkristallisiert.

Abbildung 4.57: Darstellung von 8-Hydroxymethyltheophyllin (229).²⁶³⁻²⁶⁶

Die anschließende Oxidation mit Kaliumpermanganat in Natriumhydroxid-Lösung lieferte 8-Carboxytheophyllin (230) in 55 %iger Ausbeute (siehe Abbildung 4.58).²⁶⁶ Eine Alkylierung der N7-Position von Verbindung 230 konnte unter den oben beschriebenen Bedingungen von Kić-Kononowicz nicht erreicht werden (siehe Abbildung 4.53).²⁶¹

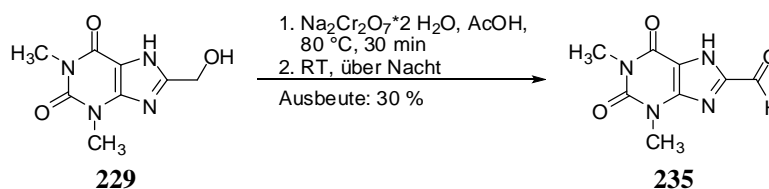


Aus diesem Grund wurden mit dem Ausgangsmaterial Theophyllin zunächst einige Vorversuche unternommen, um die Bedingungen der Reaktion zu optimieren.



Die N7-Alkylierung von Theophyllin (**232**) in Ethylenglykoldimethylether (Glyme) mit Triethylamin als Base und 3-Brom-propionsäureethylester als Alkylierungsmittel ließ sich problemlos durchführen (siehe Abbildung 4.59).

Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die Carboxygruppe eine Alkylierung verhindert. Um dies zu überprüfen, wurde anschließend ein Teil des Alkohols **229** selektiv zum Aldehyd umgesetzt (siehe Abbildung 4.60).



Dazu wurde Verbindung **229** bei 80 °C in Eisessig gelöst und fein pulverisiertes Natriumdichromat-Dihydrat wurde in kleinen Portionen unter Rühren innerhalb von 15 min

zugegeben. Die Mischung wurde weitere 30 min bei 80 °C gerührt und anschließend über Nacht abgekühlt. In dieser Zeit bildete sich weiße Kristalle, die isoliert und aufgereinigt wurden.²⁶³

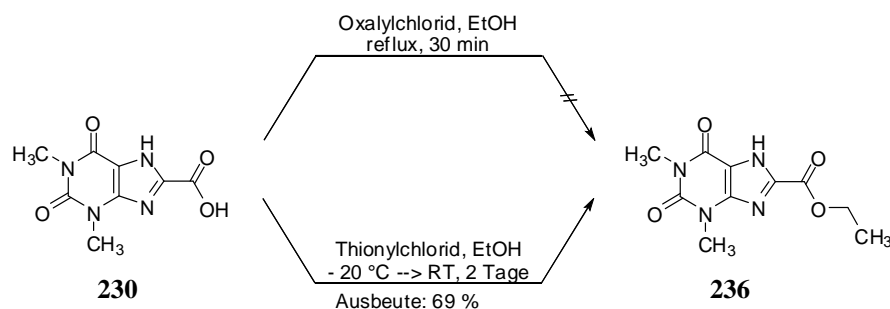


Abbildung 4.61: Von den zwei getesteten Vorschriften zur Veresterung von Verbindung **230** ergab nur die Vorschrift von Braibante et al.²⁶⁷ die Bildung von Ethyl-theophyllin-8-carboxylat (**236**).

Außerdem wurde die Säure **230** in Anlehnung an die Vorschrift von Braibante et al. mit Thionylchlorid in Ethanol verestert.²⁶⁷ Eine Veresterung durch Aktivierung der Säure mit Oxalylchlorid führte hingegen unter den durchgeführten Bedingungen zu keinem Ergebnis (siehe Abbildung 4.61).

Anschließend wurden der Alkohol **229**, der Aldehyd **235**, und der Ester **236** jeweils nach der oben beschriebenen Methode von Kiéc-Kononowicz et. al. mit Kaliumcarbonat als Base und 3-Brompropionsäureethylester als Alkylierungsmittel alkyliert. Bei diesen Reaktionen konnten im Allgemeinen gute Ausbeuten (55 - 75 %) erreicht werden. Lediglich der Alkohol ließ sich nur sehr schwer umsetzen und die Ausbeute war mit 6 % dementsprechend gering. Es scheint folglich, dass die Carboxygruppe, die sowohl einen großen –M-Effekt als auch einen stark ausgeprägten –I-Effekt besitzt, die Nucleophilie des Imidazol-Ringes so stark herabsetzt, dass eine N7-Alkylierung verhindert wird. Eine N-Alkylierung ist sowohl mit dem Aldehyd (**235**) und dem Ester (**236**), deren –I-Effekte schwächer ausgeprägt sind, als auch mit dem Alkohol (**229**), der einen +M-Effekt besitzt, möglich.

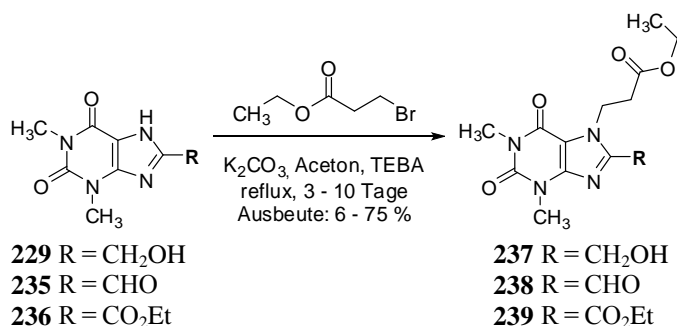


Abbildung 4.62: Eine Alkylierung der Theophyllin-Derivate **229**, **235** und **236** war mit der Methode von Kiéc-Kononowicz möglich.

Nachdem durch die N-Alkylierung von Verbindung **236** der Diester **239** erhalten werden konnte, war eine weitere Verarbeitung der Verbindungen **237** und **238** nicht notwendig. Stattdessen mussten schließlich die Ester-Schutzgruppen von Verbindung **239** abgespalten werden. Diese Reaktion sollte in Analogie zur Verseifung der Indol-Derivate nach Salituro et al. mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in Tetrahydrofuran : Wasser (1 : 1) durchgeführt werden (siehe Abbildung 4.63).²⁵².

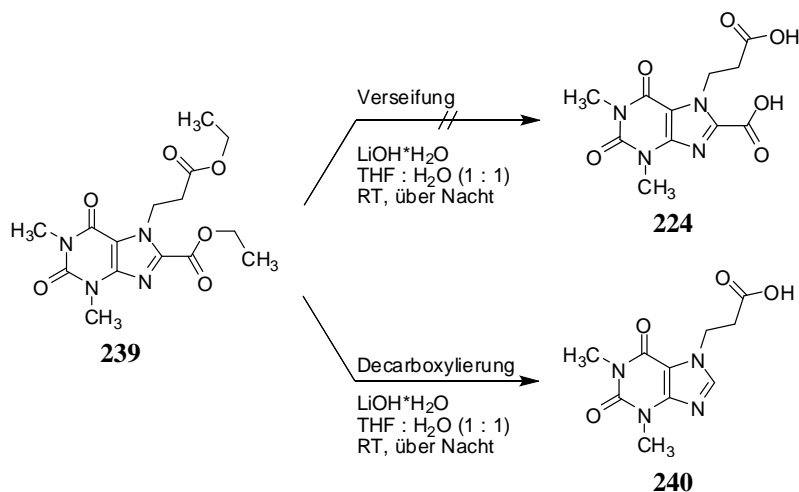


Abbildung 4.63: Die Umsetzung von Ethyl-7-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-theophyllin-8-carboxylat (**239**) mit Lithiumhydroxid-Monohydrat in THF : Wasser (1 : 1) führte zur Decarboxylierung.

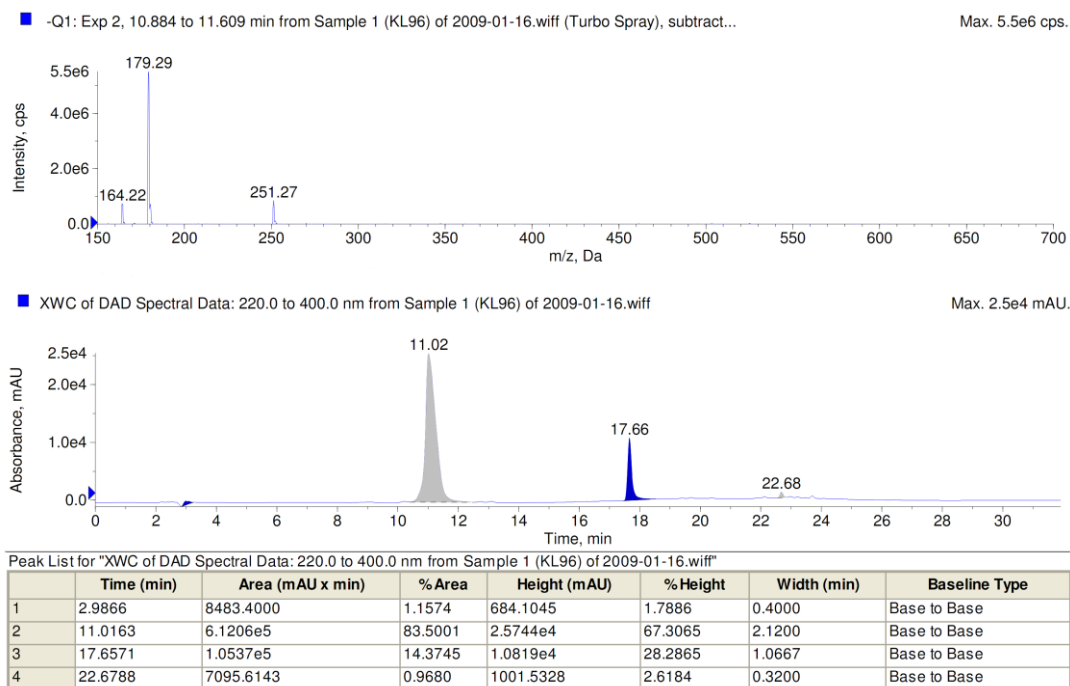


Abbildung 4.64: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der Hauptprodukte der Synthese von Verbindung **224** nach Salituro.²⁵²

Nach Aufarbeitung der Reaktionsmischung konnte das erwartete Produkt jedoch nicht detektiert werden. Das LCMS-Spektrum zeigt stattdessen als Hauptprodukt eine Verbindungen mit der Molekülmasse 252 g/mol bei einer Retentionszeit von ca. 11 min. Diese Molekülmasse könnte der decarboxlierten Verbindung **240** entsprechen. Das zugehörige ^{13}C -NMR-Spektrum belegt, dass es während der Reaktion zu einer Decarboxylierung der 2-Carboxygruppe gekommen ist (siehe Abbildung 4.65 und Abbildung 4.63). Eine weitere Fraktion mit einer Retentionszeit von ca. 17,7 min konnte im Massenspektrometer nicht detektiert werden.

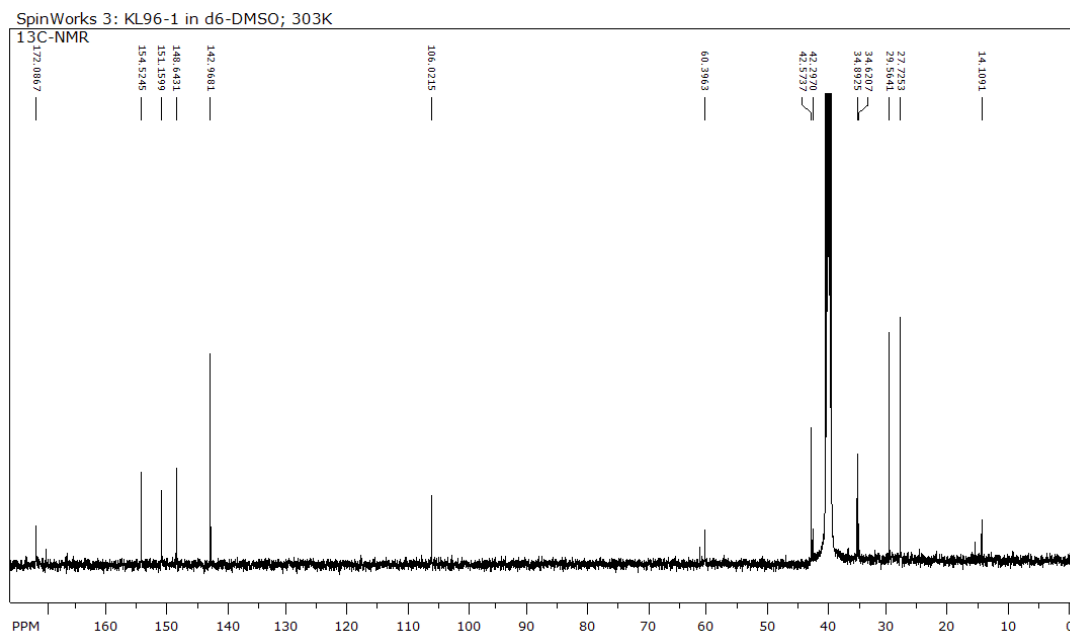


Abbildung 4.65: ^{13}C -NMR-Spektrum der Hauptprodukte der Synthese von Verbindung **224** nach Salituro.²⁵²

Alternativ wurde anschließend Verbindung **239** mit Kaliumhydroxid statt Lithiumhydroxid-Monohydrat umgesetzt. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus zwei Teilen Ethanol und einem Teil Wasser gewählt. Um eine Decarboxylierung zu verhindern, wurde die Reaktion bei Raumtemperatur gerührt und nach ca. 20 min bereits abgebrochen. Der Ethanol wurde bei Raumtemperatur entfernt und die Lösung auf pH 3 angesäuert. Da sich über Nacht kein Niederschlag gebildet hatte, wurde die Lösung mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet und bei Raumtemperatur eingedampft. Auch in dieser Reaktion wurde als Hauptprodukt wieder Verbindung **240** gebildet.

Da eine Verseifung im Alkalischen in allen Versuchen stets zu einer Decarboxylierung des C2-Restes führte, wurde in Folge eine säurekatalysierte Esterhydrolyse durchgeführt. Der offene Nachteil der Reversibilität aller Schritte des Mechanismus wurde in Kauf genommen. Verbindung **239** wurde nach Elsinghorst in Aceton gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure ver-

setzt.²⁶⁸ Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Lösung mit Ethylacetat extrahiert. Als Hauptprodukt der Reaktion konnte, unabhängig von der Reaktionsdauer, nur der Monoester gewonnen werden (siehe Abbildung 4.66). Als Nebenprodukt der Reaktion wurde eine Verbindung der Molekülmasse 338 g/mol detektiert (siehe Abbildung 4.66).

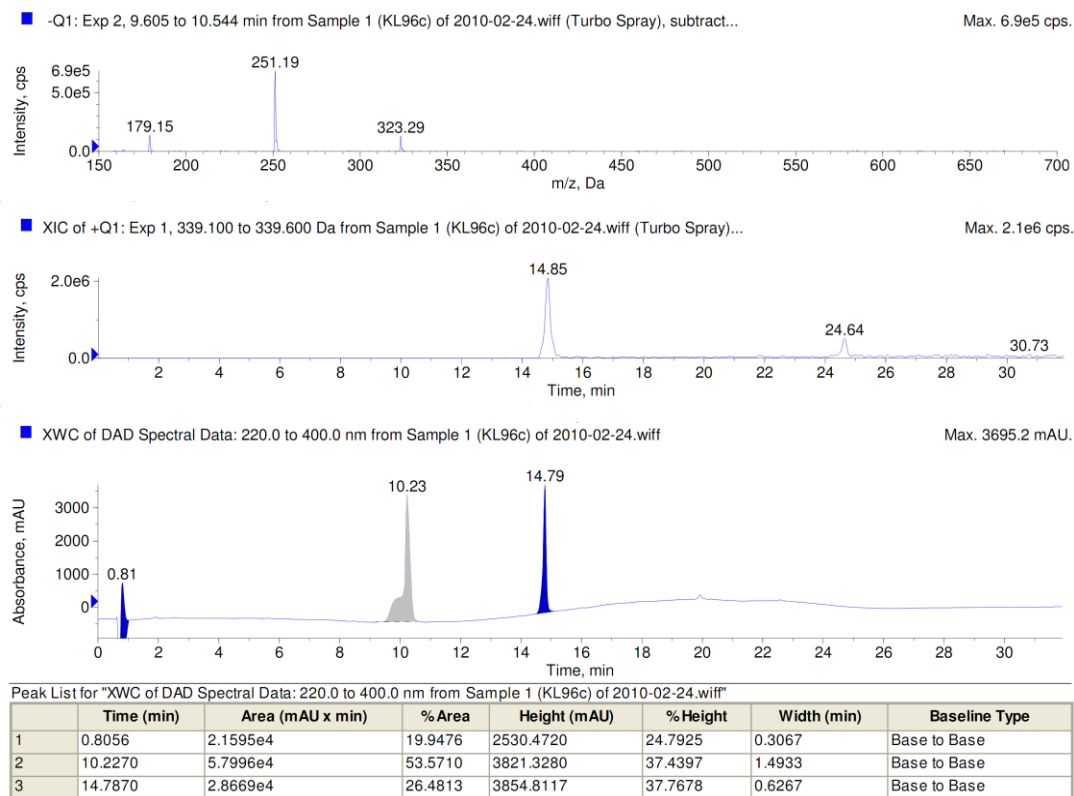


Abbildung 4.66: LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der Hauptprodukte der sauren Esterhydrolyse von Verbindung 239.

Im Vergleich zu Verbindung **239** ist die Molekülmasse des isolierten Nebenproduktes damit um 14 g/mol geringer. Die Abspaltung einer Methylgruppe kann prinzipiell ausgeschlossen werden. Die Umesterung eines Ethylesters in einen Methylester ist, da kein Methanol o. ä. verwendet wurde, ebenfalls extrem unwahrscheinlich. Möglicherweise ist es in dieser Reaktion zur Bildung des Ketylradikals **242** gekommen. Erndt et al. beschrieben eine Photoreaktion bei der Theophyllin (**232**) mit Ethern und Ketonen unter Einwirkung von UV-Licht einer Wellenlänge größer als 290 nm umgesetzt wurden.²⁶⁹ Theophyllin reagierte dabei mit Aceton (**241**) in 40–45 %iger Ausbeute unter Bildung von 8-(2-Hydroxypropan-2-yl)-theophyllin (**244**) (siehe Abbildung 4.67). Eine analoge Reaktion des Ketylradikals mit der decarboxylierten Verbindung **245** könnte zur Bildung von **247** geführt haben, welches eine Molekülmasse von 338 g/mol besitzt.

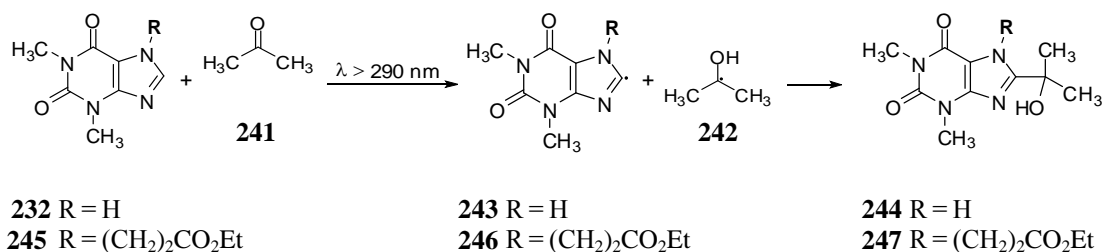


Abbildung 4.67: Erndt et al. beschrieben die Photoreaktion von Theophyllin (232) mit Ethern und Ketonen unter Einwirkung von UV-Licht mit einer Wellenlänge größer als 290 nm. In deren Verlauf wurde 8-(2-Hydroxypropan-2-yl)-theophyllin (244) gebildet.²⁶⁹

Auffällig ist auch, dass mit zunehmender Reaktionszeit der Anteil des Monoesters im Vergleich zur Verbindung mit der Molekülmasse 338 g/mol geringer wird (siehe Abbildung 4.66). Da nur sehr geringe Mengen des Nebenproduktes gewonnen wurden, konnte eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Verbindung nicht durchgeführt werden. Somit konnte eine genaue Aufklärung der tatsächlich abgelaufenen Reaktion nicht erfolgen.

Da die Verseifung mit den getesteten Vorschriften sowohl im Sauren als auch im Basischen zu einer Zersetzung des Eduktes führte, ist vermutlich ein grundlegend neuer Ansatz zur Synthese von 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**) notwendig, der im Rahmen meiner Dissertation nicht mehr realisiert werden konnte. Das Projekt wurde von Herrn Dr. Younis Baqi fortgeführt.

Eine Zusammenfassung der durchgeführten Synthesen zur Darstellung von 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**) ist in Abbildung 4.68 dargestellt.

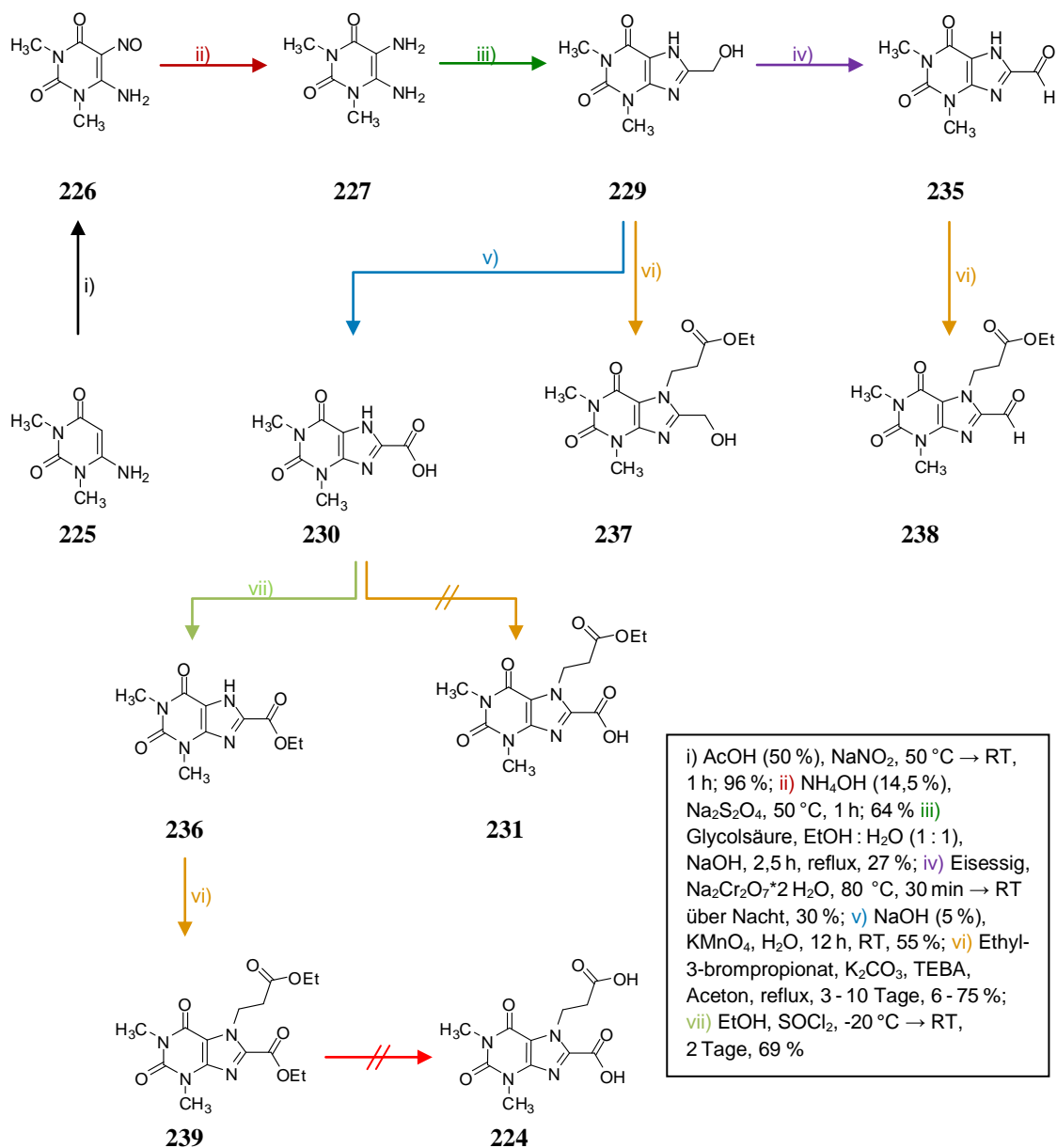


Abbildung 4.68: Zusammenfassung der durchgeführten Synthese zur Darstellung von 7-Carboxyethyl-8-carboxytheophyllin (224).

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Voraussetzungen für die Entwicklung eines agonistischen Liganden für die Positronen-Emissions-Tomographie am A₁-Rezeptor geschaffen. Als Vorläufermolekül wurde der häufig verwendete A₁-Agonist N⁶-Cyclopentyladenosin (CPA, **3**) ausgewählt. Die Monosubstitution in N⁶-Position führt bei diesem Liganden zu einer hohen Aktivität am A₁-Rezeptor und einer guten Selektivität gegenüber den anderen Adenosin-Rezeptoren. Ferner bietet die 5'-Hydroxygruppe eine gute Möglichkeit der radioaktiven Markierung mit ¹⁸F. In früheren Studien konnte bereits N⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (**34**) als nanomolarer Agonist am Ratten- und humanen A₁-Rezeptor identifiziert werden.¹⁹¹ Mit einem K_i-Wert von 1.55 nM am Ratten-A₁-Rezeptor und 5.59 nM am humanen A₁-Rezeptor ist die Verbindung hochaffin. Außerdem weist sie eine ausgeprägte Selektivität gegenüber dem A_{2A}-Rezeptor (> 6400-fach) und dem A₃-Rezeptor (> 1400-fach) auf.

Ausgehend von Inosin wurde zunächst N⁶-Cyclopentyladenosin nach bekannter Vorschrift synthetisiert. Um eine Modifikation der 5'-Position durchführen zu können, mussten anschließend die *cis*-ständigen 2'- und 3'-Hydroxygruppen adäquat geschützt werden. In früheren Experimenten wurde dazu häufig die Acetonid-Schutzgruppe (Isopropyliden-Ketal) verwendet.¹⁹⁷ Die Abspaltung der Schutzgruppe erfordert jedoch in der Regel stark saure Bedingungen und ggf. hohe Temperaturen und könnte somit auch zur Spaltung säurelabiler Bindungen, wie der nucleosidischen Bindung führen. Da die Halbwertszeit von ¹⁸F mit 110 min nur ein begrenztes Zeitfenster für die sich anschließende Abspaltung der Schutzgruppe zulässt, sollte eine Schutzgruppe verwendet werden, die zwar ausreichende Stabilität für die nächsten Reaktionen bietet, sich aber leicht und mit möglichst wenig Aufwand auch von einem radioaktiven Molekül abspalten lässt. Die Wahl fiel deshalb auf die Anisyliden-Schutzgruppe (*p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe), die auch in unserer Arbeitsgruppe schon erfolgreich eingesetzt wurde.¹⁹⁹ Die Bedingungen zur Einführung dieser Schutzgruppe in N⁶-Cyclopentyladenosin wurden optimiert und das Produkt konnte in guter Ausbeute erhalten werden. Für die sich anschließende Fluorierungsreaktion wurden verschiedene Abgangsgruppen getestet. Sowohl das Mesyl-Derivat als auch das Tosyl-Derivat konnten dargestellt werden. Das Mesyl-Derivat wurde nach der oben beschriebenen Vorschrift von Le et al. in der Mikrowelle zum 5'-Desoxy-5'-fluor-Derivat umgesetzt²⁰⁴ und die Bedingungen für die anschließende Abspaltung der *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe wurden optimiert. Eine Stabilitätsuntersuchung der Mesylat-Verbindung unter den Bedingungen der radioaktiven Fluorierung wurde von der Abteilung „Nuklearchemie“ am Institut für Neurowissenschaften und Medizin des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Dazu wurde die Verbindung unter Standardfluorierungsbedingungen mit Kryptofix® 222 und Kaliumcarbonat in DMSO bzw. Acetonitril 10 min bei 70 - 90 °C erhitzt. Obwohl eine Fluorierung in unserem

Labor unter nicht-radioaktiven Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden konnte, zeigte eine LCMS-Analyse der Reaktionsmischung, dass das Mesylat unter den radioaktiven Standard-fluorierungsbedingungen bereits nach 1,5 min bei 90 °C zu 90 % eliminiert wurde. *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) ist aufgrund seiner Instabilität folglich kein geeignetes Vorläufermolekül für die Darstellung eines PET-Liganden. Auch die Stabilität des Tosyl-Derivates wurde in gleicher Weise überprüft. Wie die Mesylat-Verbindung (**50**) wies auch das Tosylat (**58**) keine ausreichende Stabilität für die Fluorierung auf. Statt der Substitution war erneut die Eliminierung bevorzugt. Damit ist auch *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-tosyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**58**) als PET-Vorläufermolekül ungeeignet. Da keines der beiden Zielmoleküle sich als geeigneter PET-Ligand-Vorläufermolekül erwies, wurde ein weiterer Ansatz zur Synthese eines geeigneten Precursor-Moleküls ausgearbeitet.

Aufgrund seiner guten Affinität und Selektivität für den A₁-Rezeptor und einer vorhandenen Hydroxygruppe im Molekül wurde GR79236 (**12**) ausgewählt. Eine zusätzliche Substitution des Moleküls mit Chlor oder Fluor in 5'-Position verhindert die Eliminierung der 5'-Hydroxygruppe während der späteren Fluorierung. Außerdem erhöht sie die Lipophilie, was eine bessere Penetration der Blut-Hirn-Schranke bewirken könnte, und verhindert außerdem den Einbau der Verbindung in die RNA. Als neue Zielmoleküle wurden folglich 5'-Chlor-5'-deoxy-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-fluor)cyclopentyladenosin bzw. 5'-Fluor-5'-deoxy-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-fluor)cyclopentyladenosin ausgewählt.

Ausgehend vom Inosin wurden zunächst die *cis*-ständigen, vicinalen Ribose-Hydroxygruppen trifluoracetyliert. Durch Chlorierung des geschützten Inosins und anschließende Aminierung wurde *N*⁶-(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyladenosin (**81**) hergestellt. Die Chlorierung in 5'-Position des Moleküls wurde durch Umsetzung von Verbindung **81** mit Thionylchlorid erreicht. Die Fluorierung in 5'-Position von Verbindung **81** erfolgte nach der bereits oben beschriebenen Methode durch vorherige Einführung einer geeigneten Abgangsgruppe. Die Abspaltung der Hydroxygruppe des Cyclopentyl-Substituenten wurde durch katalytische Hydrierung unter Zusatz von Pearlman's Katalysator (Palladiumhydroxid auf Aktivkohle) durchgeführt. Die Schützung der *cis*-ständigen, vicinalen Ribose-Hydroxygruppen des Chlorderivates konnte jedoch nicht in ausreichender Reinheit und Ausbeute durch Verwendung der *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe erreicht werden. Da für die nun folgende Mesylverbindung eine nur geringe Stabilität zu erwarten war, die eine anschließende Aufreinigung kaum möglich machen würde und in der darauf folgenden radioaktiven Fluorierung ein sehr reines Produkt benötigt wird, war eine weitere Umsetzung der Verbindung ausgeschlossen. Statt dessen wurde das Fluor-Derivat, welches vor der vorangegangenen Fluorierung bereits mit Anisaldehyd geschützt worden war, nach der vorher schon beschriebenen Methode mit 2,6-Lutidin deprotoniert und mit

Tosylchlorid umgesetzt. Nach Aufarbeitung der Reaktion konnten das Edukt, das Produkt sowie das Eliminierungsprodukt in der Reaktionsmischung detektiert werden. Durch verschiedene analytische Methoden konnte festgestellt werden, dass einerseits die Reaktion nur in einem sehr geringen Ausmaß abläuft und andererseits bereits während der Reaktion bzw. der Aufarbeitung der Großteil des Produktes wieder eliminiert wurde. Folglich ist auch 5'-Desoxy-5'-fluor- N^6 -((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**93**) kein geeignetes Vorläufermolekül für die Positronen-Emissions-Tomographie. Abschließend wurden schließlich Versuche unternommen, 5'-Desoxy-5'-fluor- N^6 -((1*S*,2*R*)-2-fluor)cyclopentyladenosin durch gleichzeitige Fluorierung sowohl der 5'-Position als auch der N^6 -Cyclopentylfunktion herzustellen. Obwohl nach der Tosylierungsreaktion sowohl das ditosylierte Produkt (**96**) als auch das monotosylierte Produkt (**97**) erhalten worden war, konnte nach der Fluorierungsreaktion ausschließlich 5'-Desoxy-5'-fluor- N^6 -((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**90**) als Produkt identifiziert werden. Wie das vorher synthetisierte N^6 -Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) besitzen folglich auch 5'-Desoxy-5'-fluor- N^6 -((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**93**) und 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzyliden-5'-tosyl- N^6 -((1*S*,2*S*)-2-tosyl)cyclopentyladenosin (**96**) keine ausreichende Stabilität, um als PET-Precursor eingesetzt zu werden.

Die Abgangsgruppen Mesylat und Tosylat sind für die geplante radioaktive Fluorierung unter den oben beschriebenen Bedingungen scheinbar ungeeignet. Unter Umständen kann durch die Verwendung einer stabileren Abgangsgruppe wie Bromid, Iodid oder Chlorid in 5'-Position eine radioaktive Fluorierung des Moleküls erreicht werden. Die Verwendung von Bromid als Abgangsgruppe einer radioaktiven Fluorierung wurden beispielsweise von Simeon et al. publiziert.²⁷⁰ Eventuell könnte ein agonistischer PET-Ligand-Vorläufer auch auf Basis eines anderen A_1 -Agonisten realisiert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Synthese neuer Liganden für den Waisenrezeptor GPR17. In Anknüpfung an die von Dr. Rhalid Akkari durchgeführten Experimente wurden weitere Indol-2-carbonsäure-Derivate synthetisiert und von Dr. Andreas Spinrath sowie Dr. Aliaa Abdelrahman in verschiedenen funktionellen Assays untersucht. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen konnten vor allem wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedener Substituenten und -Substitutionsmuster am Phenylring, verschiedener Kettenlängen in Position 3 und verschiedener Substituenten in N1-Position von Indol-Derivaten am GPR17 gewonnen werden. Hervorzuheben sind zunächst die große Bedeutung des Chlor-Substituenten in Position 6 im Vergleich zu dem in Position 4. Außerdem konnte festgestellt werden, dass 7-substituierte Verbindungen offenbar schwach wirksame Partialagonisten am GPR17-Rezeptor sind. Ein Halogenaustausch der

Chloratome in Position 4 und 6 gegen das größere und weniger elektronegative Brom führte zu einer Verbindung, die in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen etwa 4–5fach aktiver war als die bisherige Leitstruktur (**98**). Indol-Derivate mit großen Resten in Position 4 und 6 scheinen am GPR17-Rezeptor also besonders aktiv zu sein. In weiteren Experimenten konnte die Bedeutung der 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe nachgewiesen werden. Fehlt diese Gruppe im Molekül (Verbindung **200**), ist die Verbindung vollständig inaktiv. Auch ihre Verlängerung durch Austausch gegen einen 3-(3-Carboxypropyl)-Rest (Verbindung **196**) führt zu einem vollständigen Funktionsverlust der Verbindung. Der Ersatz gegen eine 3-(2-Carboxyethyl)-Gruppe reduziert die Aktivität. Darüber hinaus kann eine 1-Carboxymethylgruppe in N1-Position das Fehlen der 3-(2-Carboxyethylgruppe) nicht kompensieren. 1-(Carboxymethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**205**) ist in beiden Zellsystemen inaktiv. Die Alken-Verbindung **212** wurde anschließend als Edukt für die Herstellung eines Radioliganden verwendet. Hierfür wurde **212** einer katalytischen Hydrierung mit gasförmigem $^3\text{H}_2$ unterworfen (Auftragsmarkierung durch die Fa. Quotient Bioscience; UK). Verbindung **213** konnte mit mäßiger spezifischer Aktivität (17 Ci/mmol = 629 GBq/mmol) in einer radiochemischen Reinheit von 99,4 % erhalten werden (siehe Abbildung 4.48).

In nachfolgenden Experimenten soll eine weitere Optimierung der Leitstruktur erfolgen. Dies kann z. B. durch den Austausch der Chlor-Substituenten durch andere große Substituenten geschehen. Interessant ist weiterhin die Untersuchung der Bedeutung der Carboxylgruppe in Position 2 sowie weitere Experimente zur Bedeutung des Restes in Position 3. Für zukünftige Experimente wäre auch ein Austausch des Indol-Grundgerüsts gegen (Iso)Chinolin oder Tetrahydro(iso)chinolin sowie die Synthese von Azaindol-Derivaten von Interesse.

Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**98**) sollte neben den Indol-Derivaten weiterhin auch das Xanthin-Derivat 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**) hergestellt werden. Da die Verseifung mit den getesteten Vorschriften sowohl im Sauren als auch im Basischen zu einer Zersetzung des Eduktes führte, ist vermutlich ein grundlegend neuer Ansatz zur Synthese von 7-(2-Carboxyethyl)-theophyllin-8-carbonsäure (**224**) notwendig, der im Rahmen meiner Dissertation nicht mehr realisiert werden konnte.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 ALLGEMEINE ANGABEN

Für die Darstellung und Charakterisierung der beschriebenen Verbindungen wurden die im Folgenden beschriebenen Chemikalien und Geräte verwendet.

6.1.1 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

Die für die Synthesen verwendeten Reagenzien sowie die zur Aufarbeitung benötigten Lösungsmittel wurden von folgenden Herstellern bezogen:

- Fluka, Riedel-de-Haen und Aldrich (Vertrieb über Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Alfa Aesar (Karlsruhe)
- VWR (Langenfeld)
- ABCR (Karlsruhe)
- Acros (Vertrieb über Fischer Scientific, Nidderau)

Die Chemikalien und Lösungsmittel wurden (wenn nicht gesondert vermerkt) ohne weitere Aufreinigung verwendet.

6.1.2 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Reaktionskontrollen wurden mit Kieselgel-beschichteten Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm.

6.1.3 SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Säulenchromatographische Aufreinigungen erfolgten über Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,060 mm bis 0,200 mm und einem Porendurchmesser von ca. 6 nm (Merck, Darmstadt).

6.1.4 GERÄTE

Präparative HPLC

Für die HPLC-Aufreinigung von Endprodukten wurde ein HPLC-System mit folgenden Gerätekomponenten verwendet:

Pumpe Wellchrome K-1800 (Knauer GmbH, Berlin), Probenauftragsschleife mit 7 ml Fassungsvermögen (Knauer GmbH, Berlin), Spektrophotometer Wellchrome K-2600 (Knauer GmbH, Berlin), Fraktionssammelventil (Knauer GmbH, Berlin), Eurospher 100-Vorsäule (Ab-

messungen 30 x 20 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer GmbH, Berlin)) und Eurospher 100-Trennsäule (Abmessungen 250 x 20 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer GmbH, Berlin)).

Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt) und deionisiertem Wasser verwendet. In einigen Fällen wurde die zu reinigende Verbindung im Startgemisch unter Zusatz von Triethylamin (99 % pur., Grüssing GmbH, Filsum) gelöst. Die Flussrate betrug 20 ml / min.

Mikrowelle

Mikrowellenreaktionen wurden in der Mikrowelle Discover der Firma CEM GmbH (Kamp-Lintfort) mit der FokussiertenTM Mikrowellen-Synthese unter Erwärmung in einem Druckbehälter durchgeführt.

Hydrierapparat

Katalytische Hydrierungen wurden mit dem Wasserstoffgenerator Hogen® GC Hydrogen Generator der Firma Proton Energy Systems (Wallingford, USA) durchgeführt.

Gefriertrocknung

Die Isolierung von Produkten aus wässrigen Lösungsmitteln wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi B-545 Schmelzpunktmessgerät (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen) aufgenommen und sind unkorrigiert angegeben.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz) bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die verwendeten Lösungsmittel DMSO-d₆, CD₃OD und CDCl₃ dienten jeweils als interner Standard: Die observierten Verschiebungen der Lösungsmittel betragen für ¹H-Spektren: δ [ppm] DMSO-d₆: 2,49; CD₃OD: 3,35; CDCl₃: 7,24 und für ¹³C-Spektren: δ [ppm] DMSO-d₆: 37,7; CD₃OD: 49,3; CDCl₃: 77,0. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz [Hz] und die chemischen Verschiebungen in parts per million [ppm] angegeben. Signalaufspaltungen werden mit folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit.

HPLC-MS

Reinheit und Identität der Endprodukte und Vorstufen wurden mit einem an ein API 2000 Massenspektrometer (Elektronensprayionisation, Applied Biosystems, Darmstadt) gekoppelten Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie-System (Agilent 1100, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) bestimmt. Es wurden 1 mg der zu prüfenden Substanz in einem Milliliter Methanol gelöst. Davon wurden 10 µl in das HPLC-System injiziert und über eine Phenomenex Luna C-18-Säule (Korngröße 3 µm, Abmessungen 50 x 2,00 mm innerer Durchmesser, Phenomenex, Aschaffenburg) mit einem Gradienten aus Wasser : Methanol von 90 : 10 nach 0 : 100 über 30 min unter Zusatz von 2 mM Ammoniumacetat chromatographiert. Der Gradient wurde nach 10 min gestartet. Die Flussrate betrug 250 µl / min. Die UV-Absorption wurde mit einem Dioden-Array-Detektor über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 950 nm aufgenommen. Die Reinheit der Verbindungen wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt.

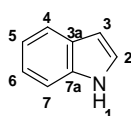
Elementaranalyse

Elementaranalysen wurden mit einem VarioEL Gerät (ElementarAnalysensysteme GmbH, Hanau) aufgenommen. Eine elementaranalytische Reinheitsbestimmung war bei denjenigen Indol-Derivaten, die unter Zusatz von Triethylamin durch präparative HPLC aufgereinigt worden waren, grundsätzlich nicht möglich.

Reinheitsbestimmung per HPLC-ESI-MS

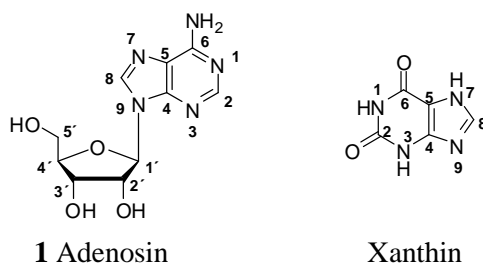
In Fällen, in denen eine Elementaranalyse nicht möglich war (zu große Hygroskopizität, zu große Instabilität, oder zu geringe Ausbeuten der betreffenden Substanz sowie Triethylamin-Salze von Indol-Derivaten), wurde eine Reinheitsbestimmung per HPLC mit folgendem System vorgenommen: 1 mg Substanz wurde in einer Mischung aus 1 ml wässriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und Methanol (90 : 10) gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 µl in ein HPLC-System (Agilent 1100, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) mit Phenomenex Luna C18 Säule injiziert. Der Analyt wurde mit einem Gradienten aus Wasser : Methanol von 90 : 10 nach 0 : 100 über 30 min unter Zusatz von 2 mM Ammoniumacetat bei einer Flussrate von 250 µl / min eluiert. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption, bei einer Wellenlänge von 254 nm.

6.2 IUPAC-ZÄHLWEISE FÜR INDOL-DERIVATE



Indol

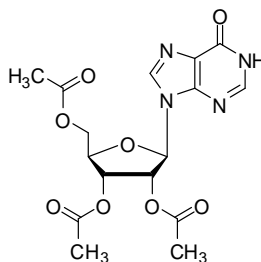
6.3 IUPAC-ZÄHLWEISE FÜR NUCLEOSID-DERIVATE



6.4 PROJEKT 1: SYNTHESE VON *N*⁶-SUBSTITUIERTEN ADENOSIN-DERIVATEN ALS LIGANDEN FÜR DIE POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE (PET)

6.4.1 EINFÜHRUNG DER INOSIN-RIBOSE-SCHUTZGRUPPEN

6.4.1.1 Darstellung von 2',3',5'-Tri-*O*-acetylinosin (36, KL1)¹⁹⁴



7,97 g (29,7 mmol) Inosin und 0,20 g (1,63 mmol) Dimethylaminopyridin wurden zu einer Mischung aus 13,0 ml (120 mmol) Ethyldimethylamin und 9,4 ml (100 mmol) Acetanhydrid in 100 ml Acetonitril gegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Durch die Zugabe von 5 ml Methanol wurde die Reaktion abgebrochen. Die flüchtigen Reagenzien wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 10,5 g (90 %)

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,49$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 238 °C (Lit.: 236-238 °C)²⁷¹

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2,01 (s, 3H, CH₃(Acetyl)); 2,03 (s, 3H, CH₃(Acetyl)); 2,10 (s, 3H, CH₃(Acetyl)); 4,22 - 4,26 (m, 1H, H-4'); 4,35 - 4,39 (m, 2H, 2 x H-5'); 5,54 (dd, 1H, ³*J* = 5,0 Hz,

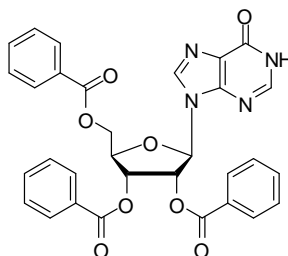
$^3J = 5,9$ Hz, H-3`); 5,89 (pseudo-t, 1H, $^3J = 5,7$ Hz, H-2`); 6,17 (d, 1H, $^3J = 5,5$ Hz, H-1`); 8,08 (s, 1H, H-2); 8,29 (s, 1H, H-8); 11,89 – 12,91 (br, 1H, NH)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 20,30 ($\text{CH}_3(\text{Acetyl})$); 20,47 ($\text{CH}_3(\text{Acetyl})$); 20,61 ($\text{CH}_3(\text{Acetyl})$); 62,91 (C-5'); 70,11 (C-2'); 72,37 (C-3'); 79,68 (C-4'); 85,78 (C-1'); 124,96 (C-5); 139,41 (C-8); 146,42 (C-2); 148,09 (C-4); 156,57 (C(6)=O); 169,55 (C=O(Acetyl)); 169,37 (C=O(Acetyl)); 170,15 (C=O(Acetyl))

ESI-MS: 393,2 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); 395,4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Elementaranalyse: ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8$): N: 14,06 % (theoret.: 14,21 %); C: 48,77 % (48,73 %); H: 4,483 % (4,60 %); C/N: 3,470 (3,429)

6.4.1.2 Darstellung von 2',3',5'-Tri-*O*-benzoylinosin (41, KL51)^{194,196}



*Methode A:*¹⁹⁶

Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus 5,00 g (18,6 mmol) Inosin in 10 ml Pyridin wurden zuerst 25 ml Chloroform und dann 10,0 g (71,1 mmol) Benzoylchlorid gegeben. Die Mischung wurde 2 h bei 100 °C gerührt, wobei das Chloroform über eine Destillationsbrücke entfernt wurde. Der entstandene Sirup wurde erneut in 100 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wurde anschließend erst mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde die Chloroform-Lösung im Vakuum zu einem Sirup eingedunstet, aus dem, nach einer Behandlung mit wasserfreiem Diethylether, 2',3',5'-Tri-*O*-benzoylinosin als weißer Niederschlag ausfiel.

Ausbeute: 9,71 g (90 %) (Lit.: 92 %)¹⁹⁶

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,86$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 141 °C (Lit: 139 – 142 °C)²⁷²

Leicht löslich in: Dichlormethan

Schwer löslich in: Ethylacetat, Methanol, Petrolether

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 4,65 (dd, 1H, ³*J* = 4,9 Hz, ²*J* = 12,2 Hz, H-5'); 4,78 (dd, 1H, ³*J* = 4,8 Hz, ²*J* = 12,2 Hz, H-5'); 4,84 (pseudo-q, 1H, ³*J* = 4,7 Hz, H-4'); 6,17 (pseudo-t, 1H, ³*J* = 5,9 Hz, H-3'); 6,37 (dd, 1H, ³*J* = 4,8 Hz, ³*J* = 5,9 Hz, H-2'); 6,54 (d, 1H, ³*J* = 4,7 Hz, H-1'); 7,42 – 7,98 (m, insg. 16H, 15 x H_{arom} und H-2); 8,34 (s, 1H, H-8); 12,42 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 63,36 (C-5'); 70,81 (C-2'); 73,42 (C-3'); 79,43 (C-4'); 86,61 (C-1'); 125,15 (C-5); 128,83 – 134,12 (9 Signale, 9 x C_{arom}); 139,87 (C-8); 146,23 (C-2); 147,99 (C-4); 156,49 (C(6)=O); 164,60 (C=O(Benzoyl)); 164,78 (C=O(Benzoyl)); 165,53 (C=O(Benzoyl))

ESI-MS: 579,5 ([M-H]⁻); 581,4 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 100 %

Elementaranalyse: (C₃₁H₂₄N₄O₈): N: 9,415 % (theoret.: 9,65 %); C: 63,53 % (64,13 %); H: 4,167 % (4,17 %); C/N: 6,748 (6,646)

*Methode B:*¹⁹⁴

8,00 g (29,7 mmol) Inosin und 0,20 g (1,63 mmol) Dimethylaminopyridin wurden zu einer Mischung aus 13,0 ml (120 mmol) Ethyldimethylamin, 30,0 ml Dichlormethan und 14,0 g (100 mmol) Benzoylchlorid in 100 ml Acetonitril gegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die flüchtigen Reagenzien wurden anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 ml Dichlormethan gelöst. Im Anschluss wurde der Rückstand dreimal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt.

Ausbeute: 16,7 g (97 %)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: R_f = 0,85 (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 140 °C (Lit: 139 – 142 °C)²⁷²

Leicht löslich in: Dichlormethan

Schwer löslich in: Ethylacetat, Methanol, Petrolether, Wasser

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 4,65 (dd, 1H, ³*J* = 4,9 Hz, ²*J* = 12,2 Hz, H-5'); 4,78 (dd, 1H, ³*J* = 3,7 Hz, ²*J* = 12,2 Hz, H-5'); 4,84 (pseudo-q, 1H, ³*J* = 4,7 Hz, H-4'); 6,17 (pseudo-t, 1H, ³*J* = 5,9 Hz, H-3'); 6,37 (dd, 1H, ³*J* = 4,7 Hz, ³*J* = 6,0 Hz, H-2'); 6,54 (d, 1H, ³*J* = 4,7 Hz, H-1'); 7,42 – 7,52 (m, insg. 6H, 6 x H_{arom}); 7,62 – 7,68 (m, insg. 3H, 3 x H_{arom}); 7,88 (dd, insg. 2H, ⁴*J* = 1,4 Hz, ³*J* = 8,3 Hz, 2 x H_{arom}); 7,93 (m, insg. 3H, 2 x H_{arom} und H-2); 7,98 (dd, insg. 2H, ⁴*J* = 1,4 Hz, ³*J* = 8,3 Hz, 2 x H_{arom}); 8,34 (s, 1H, H-8); 12,42 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 63,36 (C-5'); 70,81 (C-2'); 73,41 (C-3'); 79,42 (C-4'); 86,61 (C-1'); 125,15 (C-5); 128,43 – 134,12 (9 Signale, 9 x C_{arom}); 139,85 (C-8); 146,27 (C-2); 147,99 (C-4); 156,54 (C(6)=O); 164,60 (C=O(Benzoyl)); 164,78 (C=O(Benzoyl)); 165,53 (C=O(Benzoyl))

ESI-MS: 579,3 ($[M-H]^-$); 581,3 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 96,5 %

Elementaranalyse: ($C_{31}H_{24}N_4O_8$): N: 9,441 % (theoret.: 9,65 %); C: 63,44 % (64,13 %); H: 4,30 % (4,17 %); C / N: 6,72 (6,65)

6.4.2 CHLORIERUNG

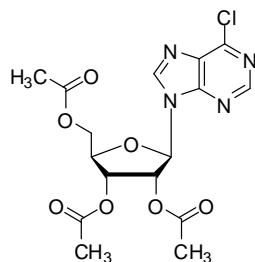
Vorschrift A:

15,2 mmol des 2',3',5'-*O*-geschützten Inosin-Derivates wurden in eine Mischung aus 1,9 ml (15,2 mmol) *N,N*-Dimethylanilin in 20 ml frisch destilliertem Phosphorylchlorid gegeben. Die Lösung wurde auf 100 °C erhitzt, bis eine klare, orange Lösung entstanden war. Anschließend wurde das Phosphorylchlorid bei 40 °C im Vakuum entfernt und der Rückstand unter Eiskühlung mit Eis hydrolysiert. Die Suspension wurde anschließend eine Stunde unter Eiskühlung gerührt und die wässrige Lösung dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit 1 N Salzsäure, zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.¹⁹⁵

Vorschrift B:

Eine weiße, zähe Suspension aus 5,00 g (18,6 mmol) Inosin und 30 ml (214 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid in 100 ml Dichlormethan wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die nun klare Lösung wurde im Vakuum unter vermindertem Druck eingeeengt. Der entstandene Schaum wurde in Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde eine vorbereitete Lösung aus 3,8 ml *N,N*-Dimethylformamid und 7,6 ml (104 mmol) frisch destilliertem Thionylchlorid in 200 ml Dichlormethan über einen Zeitraum von 10 min zugetropft. Es entstand eine weiße, zähe und voluminöse Suspension. Diese wurde 16 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend unter vermindertem Druck auf die Hälfte eingeeengt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 3 x 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das zurückbleibende, gelbe Öl in 16,2 ml Methanol gelöst und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Am nächsten Tag hatte sich ein Niederschlag gebildet, der abfiltriert und im Vakuum getrocknet wurde.²⁷³

6.4.2.1 Darstellung von 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)purin (**37**, KL2)¹⁹⁵



6,00 g (15,2 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetylinsosin (**36**) wurden bei 140 °C im Ofen getrocknet, anschließend nach Vorschrift A umgesetzt und ohne Aufreinigung weiter verwendet.¹⁹⁵

Ausbeute: 5,20 g (82 %)

Aussehen: fleischfarbener, schaumartiger Feststoff

DC: $R_f = 0,58$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

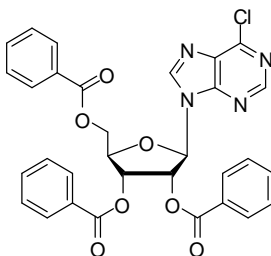
Leicht löslich in: DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Dichlormethan, Chloroform

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2,00 (s, 3H, CH₃(Acetyl)); 2,03 (s, 3H, CH₃(Acetyl)); 2,11 (s, 3H, CH₃(Acetyl)); 4,25 - 4,29 (m, 1H, H-4'); 4,39 – 4,44 (m, insg. 2H, 2 x H-5'); 5,64 (dd, 1H, ³*J* = 5,3 Hz, ³*J* = 5,8 Hz, H-3'); 6,02 (pseudo-t, 1H, ³*J* = 5,2 Hz, ³*J* = 5,8 Hz, H-2'); 6,36 (d, 1H, ³*J* = 5,1 Hz, H-1'); 8,84 (s, 1H, H-2); 8,88 (s, 1H, H-8)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 20,31 (CH₃(Acetyl)); 20,47 (CH₃(Acetyl)); 20,59 (CH₃(Acetyl)); 62,80 (C-5'); 70,05 (C-2'); 72,25 (C-3'); 79,89 (C-4'); 86,41 (C-1'); 131,74 (C-5); 146,47 (C-8); 19,81 (C-2); 151,43 (C-4); 152,08 (C-6); 169,35 (C=O(Acetyl)); 169,51 (C=O(Acetyl)); 170,12 (C=O(Acetyl))

6.4.2.2 Darstellung von 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)purin (**42**, KL53)²⁷⁴



8,82 g (15,2 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzoylinsosin (**41**) wurden nach Vorschrift A umgesetzt.¹⁹⁵

Ausbeute: 3,80 g (42 %)

Aussehen: rosafarbener, schaumartiger Feststoff

DC: $R_f = 0,79$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 114 °C (Lit: 114 – 115 °C)²⁷⁴

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Petrolether, Wasser

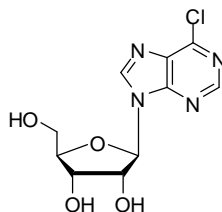
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 4,67 (dd, 1H, $^3J = 4,8$ Hz, $^2J = 12,4$ Hz, H-5'); 4,78 (dd, 1H, $^3J = 3,7$ Hz, $^2J = 12,2$ Hz, H-5'); 4,90 (pseudo-q, 1H, $^3J = 4,7$ Hz, H-4'), 6,27 (pseudo-t, 1H, $^3J = 5,9$ Hz, H-3'); 6,48 (dd, 1H, $^3J = 4,5$ Hz, $^3J = 6,0$ Hz, H-2'); 6,71 (d, 1H, $^3J = 4,5$ Hz, H-1'); 7,42 – 7,98 (m, insg. 15H, 15 x H_{arom}); 8,64 (s, 1H, H-8); 8,93 (s, 1H, H-2)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 63,23 (C-5'); 70,77 (C-2'); 73,27 (C-3'); 79,69 (C-4'); 87,07 (C-1'); 128,47 – 134,11 (insg. 10 Signale, 9 x C_{arom} und C-5); 146,83 (C-8); 149,81 (C-4); 151,37 (C-2); 151,89 (C-6); 164,61 (C=O(Benzoyl)); 164,77 (C=O(Benzoyl)); 165,51 (C=O(Benzoyl))

ESI-MS: 599,3 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 98,7 %

6.4.2.3 Darstellung von 6-Chlor-9-(β -D-ribofuranosyl)purin (79, KL82)²⁷³



5,00 g (18,6 mmol) Inosin wurden entsprechend Vorschrift B zu 6-Chlor-9-(β -D-ribofuranosyl)purin umgesetzt.²⁷³

Ausbeute: 2,69 g (50 %) (Lit.: 80 %)²⁷³

Aussehen: farbloser Schaum

DC: $R_f = 0,73$ (25 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 160 °C (Lit: 161 – 163 °C)²⁷³

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Hexan, Pentan, Petrolether, Wasser

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,56 – 3,60 (m, 1H, H-5'); 3,68 – 3,72 (m, 1H, H-5'); 3,98 (q, 1H, $^3J = 4,0$ Hz, H-4'); 4,19 (dd, 1H, $^3J = 4,3$ Hz, $^3J = 4,9$ Hz, H-3'); 4,58 (pseudo-q, 1H, $^3J = 5,3$ Hz, H-2'); 5,05 (t, 1H, $^3J = 5,5$ Hz, 5'-OH); 5,21 (d, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, 3'-OH); 5,53 (d, $^3J = 5,8$ Hz, 2'-OH); 6,04 (d, 1H, $^3J = 5,3$ Hz, H-1'); 8,80 (s, 1H, H-2); 8,93 (s, 1H, H-8)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 61,15 (C-5'); 70,20 (C-2'); 74,08 (C-3'); 85,87 (C-4'); 88,31 (C-1'); 131,53 (C-5); 145,90 (C-8); 149,44 (C-4); 151,77 (C-6); 151,88 (C-2)

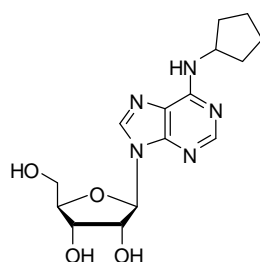
ESI-MS: 284,8 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,2 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}_4$): N: 19,30 % (theoret.: 19,54 %); C: 41,85 % (41,9 %); H: 3,913 % (3,87 %); C / N: 2,168 (2,144)

6.4.3 AMINIERUNG

6.4.3.1 Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyladenosin (3, KL3)²⁷⁵



Methode A:

1,24 g (3,00 mmol) 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)purin (**37**) und 14,9 ml (150 mmol) Cyclopentylamin wurden miteinander in einem Kolben drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das überschüssige Cyclopentylamin wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 1 ml Ethanol gelöst. Das Nebenprodukt *N*-Cyclopentylacetamid wurde durch Zugabe von Diethylether ausgefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde erneut unter vermindertem Druck eingengt und in 1 ml Ethanol gelöst. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe von Petrolether gefällt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt. Dazu wurde ein Lösungsmittelgradient von 5 % Isopropanol in Dichlormethan nach 20 % Isopropanol in Dichlormethan verwendet.²³³

Ausbeute: 453 mg (45 %)

Aussehen: farblose, faserige Kristalle

DC: R_f = 0,23 (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 121 °C (Lit.: 120-122 °C)²⁷⁵

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Ethanol, Methanol

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 1,52 – 1,61 (br, insg. 4H, CH_2 (Cyclopentyl)); 1,68 – 1,72 (br, insg. 2H, CH_2 (Cyclopentyl)); 1,92 – 1,95 (br, insg. 2H, CH_2 (Cyclopentyl)); 3,52 – 3,57 (m, 1H, H-5'); 3,64 – 3,68 (m, 1H, H-5'); 3,95 (dd, 1H, 3J = 3,5 Hz, 3J = 6,7 Hz, H-4'); 4,14 (dd, 1H,

$^3J = 3,2$ Hz, $^3J = 4,8$ Hz, H-3'); 4,44–4,56 (br, 1H, N^6 -CH); 4,59 (dd, 1H, $^3J = 5,1$ Hz, $^3J = 6,1$ Hz, H-2'); 5,12 (d, 1H, $^3J = 4,6$ Hz, 3'-OH); 5,36–5,39 (m, insg. 2H, 2'-OH und 5'-OH); 5,87 (d, 1H, $^3J = 6,2$ Hz, H-1'); 7,70–7,71 (br, 1H, NH); 8,18 (s, 1H, H-8); 8,32 (s, 1H, H-2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 23,62 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 32,36 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 51,66 (N^6 -CH); 61,83 (C-5'); 70,80 (C-2'); 73,62 (C-3'); 86,04 (C-4'); 88,11 (C-1'); 119,75 (C-5); 139,68 (C-8); 148,44 (C-4); 152,41 (C-2); 154,56 (C-6)

ESI-MS: 334,4 ($[\text{M-H}]^-$); 336,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,0 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$): N: 18,07 % (theoret.: 18,86 %); C: 49,67 % (48,51 %); H: 6,817 % (6,786 %); C / N: 2,749 (2,572)

Methode B:

600 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)purin (**42**) und 5,0 ml (50,0 mmol) Cyclopentylamin wurden miteinander in einem Kolben 6 h bei 60 °C gerührt. Das überschüssige Cyclopentylamin wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 90 : 10) aufgereinigt.²³³

Ausbeute: 209 mg (62 %)

Aussehen: altrosafarbene Kristalle

DC: $R_f = 0,26$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 121 °C (Lit.: 120 - 122 °C)²⁷⁵

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Ethanol, Methanol

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,52–1,60 (br, insg. 4H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,70–1,72 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,93–1,95 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 3,52–3,57 (m, 1H, H-5'); 3,64–3,68 (m, 1H, H-5'); 3,95 (dd, 1H, $^3J = 3,4$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H-4'); 4,14 (dd, 1H, $^3J = 3,1$ Hz, $^3J = 4,7$ Hz, H-3'); 4,43–4,56 (br, 1H, N^6 -CH); 4,59 (dd, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, $^3J = 6,0$ Hz, H-2'); 5,13 (d, 1H, $^3J = 4,6$ Hz, 3'-OH); 5,36–5,39 (m, insg. 2H, 2'-OH und 5'-OH); 5,87 (d, 1H, $^3J = 6,2$ Hz, H-1'); 7,70–7,71 (br, 1H, NH); 8,18 (s, 1H, H-8); 8,32 (s, 1H, H-2)

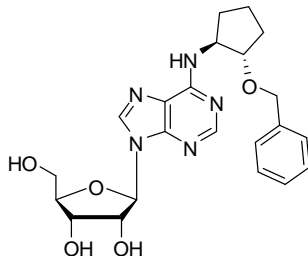
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 23,59 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 32,23 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 51,66 (N^6 -CH); 61,80 (C-5'); 70,76 (C-2'); 73,59 (C-3'); 86,00 (C-4'); 88,07 (C-1'); 119,88 (C-5); 139,64 (C-8); 148,38 (C-4); 152,38 (C-2); 154,54 (C-6)

ESI-MS: 334,1 ($[\text{M-H}]^-$); 336,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,7 %

Elementaranalyse: ($C_{15}H_{21}N_5O_4 \cdot H_2O$): N: 19,81 % (theoret.: 19,82 %); C: 51,37 % (50,98 %); H: 6,501 % (6,56 %); C / N: 2,593 (2,572)

6.4.3.2 Darstellung von N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyladenosin (**81**, KL89)²²⁴



Zu einer Lösung aus 1,05 g (3,68 mmol) 6-Chlor-9-(β -D-ribofuranosyl)purin (**79**) in 50 ml Ethanol wurden 1,1 ml (7,68 mmol) Triethylamin und 0,70 g (3,68 mmol) (1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)-cyclopentylamin zugetropft. Diese Mischung wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zwischen Ethylacetat und Wasser (100 ml : 200 ml) verteilt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 75 ml Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und das Produkt durch Zugabe von Hexan gefällt. Anschließend wurde der gelbliche, klebrige Niederschlag in Dichlormethan gelöst und erneut unter vermindertem Druck eingengt. Dabei entstand ein rosafarbener Schaum, der ohne Aufreinigung weiter verwendet wurde.²²⁴

Ausbeute: 1,45 g (89 %)

Aussehen: rosafarbener Schaum

DC: $R_f = 0,31$ (100 % Dichlormethan)

Smp.: 146 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Petrolether, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 1,50–1,60 (br, 1H, CH_2 (Cyclopentyl)); 1,70–1,80 (br, insg. 2H, CH_2 (Cyclopentyl)); 1,81–1,95 (br, insg. 2H, CH_2 (Cyclopentyl)); 2,23–2,33 (br, 1H, CH_2 (Cyclopentyl)); 3,70 (d, 1H, $^3J = 12,7$ Hz, H-5'); 3,84–3,88 (m, 1H, Cyclopentyl-CH-O); 3,90 (dd, 1H, $^3J = 1,2$ Hz, $^2J = 12,7$ Hz, H-5'); 4,28–4,30 (br, 1H, H-4'); 4,39 (d, 1H, $^3J = 4,9$ Hz, H-3'); 4,52–4,56 (m, 1H, N^6 -CH); 4,61 (d, 2H, $^3J = 5,9$ Hz, $\underline{CH_2}$ -Ph); 4,98 (dd, 1H, $^3J = 5,0$ Hz, $^3J = 7,2$ Hz, H-2'); 5,74 (d, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, H-1'); 7,28 (m, insg. 5H, 5 x H_{arom}); 7,70 (s, 1H, H-2); 8,15 (s, 1H, H-8); (1 Signal (NH) nicht detektierbar)

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ 21,57 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 30,22 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{Cyclopentyl})$); 30,63 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 56,89 ($\text{N}^6\text{-CH}$); 63,21 (C-5'); 71,19 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$); 72,60 (C-3'); 73,62 (C-2'); 84,74 (Cyclopentyl-CH-O); 87,67 (C-4'); 91,20 (C-1'); 120,80 (C-5); 127,50 – 128,32 (3 Signale, 3 x C_{arom}); 138,51 ($\text{CH}_2\text{-CH}_{\text{arom}}$); 139,85 (C-8); 147,25 (C-4); 152,42 (C-2); 154,41 (C-6)

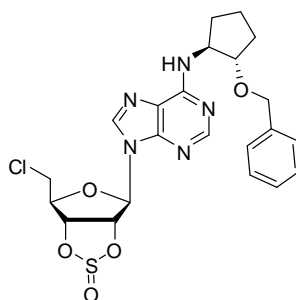
ESI-MS: 440,0 ($[\text{M-H}]^-$); 442,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 92,8 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$): N: 15,10 % (theoret.: 15,55 %); C: 58,91 % (58,66 %); H: 6,114 % (6,26 %); C / N: 3,901 (3,772)

6.4.4 CHLORIERUNG DER 5'-POSITION MIT GLEICHZEITIGER SCHÜTZUNG DER 2',3'-HYDROXYGRUPPEN

6.4.4.1 Darstellung von N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin (**82**, KL90)²²⁴



1,17 g (2,65 mmol) N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyladenosin (**81**) wurden in 10 ml Acetonitril und 0,42 ml (5,30 mmol) Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. 1 ml (13,3 mmol) frisch destilliertes Thionylchlorid wurde tropfenweise zu der rötlichen Suspension hinzugegeben. Die Mischung wurde 4 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die nun klare Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Es wurde eine Mischung aus N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin und der bereits entschützten Verbindung N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (**83**) erhalten, die ohne Trennung im nächsten Schritt entschützt wurden.²²⁴

Aussehen: hellbrauner Schaum

DC: R_f = 0,77 (10 % Ethanol in Dichlormethan): N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin

R_f = 0,48 (10 % Ethanol in Dichlormethan): N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Petrolether, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser

ESI-MS: 503,9 ($[M-H]^-$); 506,0 ($[M+H]^+$): N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin

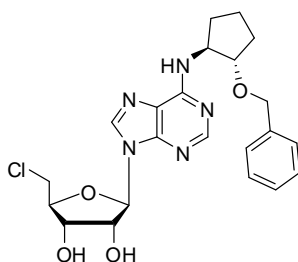
458,0 ($[M-H]^-$); 460,0 ($[M+H]^+$): N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin

Reinheit laut ESI-MS: 40,4 %: N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin

19,1 %: N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin

6.4.5 ABSPALTUNG DER 2',3'-*O*-SULFINYL-SCHUTZGRUPPE

6.4.5.1 Darstellung von N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (83, KL92)²²⁴



691 mg (1,37 mmol) N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxy-2',3'-*O*-sulfinyladenosin (**82**) wurden in 17 ml Methanol und 1 ml Wasser gelöst. Es wurden 1,1 ml wässrige Ammoniak-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum eingengt und der Rückstand mit 8 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Das entstandene Produkt wurde ohne Aufreinigung für den nächsten Schritt verwendet.²²⁴

Ausbeute: 404 mg (64 %)

Aussehen: hellbeigefarbene Kristalle

DC: R_f = 0,75 (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 59 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Ethylacetat, Methanol

Schwer löslich in: Wasser

¹H-NMR (DMSO-d⁶): δ 1,59–1,74 (br, insg. 4H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,91–1,97 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 2,03–2,09 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 3,76 (dd, insg. 2H, ³*J* = 4,5 Hz, ³*J* = 9,6 Hz, H-5'); 3,84 (dd, 1H, ³*J* = 6,3 Hz, ²*J* = 11,6 Hz, H-5'); 3,94 (dd, 1H, ³*J* = 5,0 Hz, ²*J* = 11,6 Hz, H-5'); 3,99–4,01 (br, 1H, Cyclopentyl-CH-O); 4,09 (dd, 1H, ³*J* = 5,5 Hz, ³*J* = 8,0 Hz, H-3'); 4,23 (dd, 1H, ³*J* = 4,5 Hz, ³*J* = 8,9 Hz, H-4'); 4,46–4,60 (m, insg. 3H, CH₂-Ph und N⁶-CH); 4,75 (dd, 1H, ³*J* = 5,5 Hz, ³*J* = 10,7 Hz, H-2'); 5,41 (d, 1H, ³*J* = 5,0 Hz, OH); 5,55 (d, 1H, ³*J* = 5,8 Hz, OH); 5,94 (d, 1H, ³*J* = 5,5 Hz, H-1'); 7,21–7,29 (m, insg. 5H, H_{arom}); 7,84 (s, 1H, H-2); 8,34 (s, 1H, H-8); (1 Signal (NH) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (DMSO-d⁶): δ 21,53 (CH₂(Cyclopentyl)); 21,74 (CH₂(Cyclopentyl)); 30,33 (CH₂(Cyclopentyl)); 44,97 (C-5'); 55,00 (N⁶-CH); 70,26 (CH₂-Ph); 71,40 (C-2'); 72,86 (C-3'); 83,80 (Cyclopentyl-CH-O-); 84,31 (C-4'); 87,68 (C-1'); 119,64 (C-5); 127,26–128,23 (3 Signale, C_{arom}); 139,11 (CH₂-CH_{arom}); 139,61 (C-8); 148,99 (C-4); 152,68 (C-2); 154,36 (C-6)

ESI-MS: 458,4 ([M-H]⁻); 460,3 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 86,9 %

Elementaranalyse: (C₂₂H₂₆ClN₅O₄ • EtOAc): N: 12,57 % (theoret.: 12,78 %); C: 56,51 % (56,98 %); H: 6,045 % (6,25 %); C / N: 4,496 (4,459)

6.4.6 SCHUTZ DER 2',3'-HYDROXYGRUPPEN

Vorschrift C:

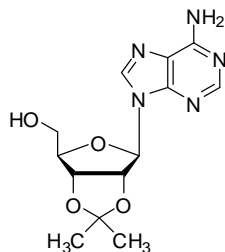
Ein Äquivalent des Adenosin-Derivates, 2–10 ml trockenes *N,N*-Dimethylformamid, zwei Äquivalente *p*-Anisaldehyd Dimethylacetal und 2–10 mg *p*-Toluensulfonsäure wurden bei 70 °C und 70 mbar gerührt, bis kein Methanol mehr entstand. Dann wurden 20–24 mg Natriumhydrogencarbonat dazugegeben und die Mischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5) gereinigt.²⁰¹

Vorschrift D:

Eine Mischung aus 100 mg des Adenosin-Derivates, 2,0 ml Triethylorthoformiat, fünf Äquivalenten *p*-Anisaldehyd und vier Äquivalenten *p*-Toluensulfonsäure wurde 4 h bei 35–40 °C unter Schutzgas gerührt. Die entstandene violette Lösung wurde anschließend in 10 ml einer 0,3 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegossen und 15 min kräftig gerührt. 50 ml Ethylacetat wurden hinzugegeben und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 ml

gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert.²⁰²

6.4.6.1 Darstellung von 2',3'-*O*-*p*-Isopropylidenadenosin (44, KL7)¹⁹⁸



100 mg (0,38 mmol) Adenosin (**1**) wurden in 12,5 ml Aceton suspendiert. Es wurden 60 mg *p*-Toluensulfonsäure und 1,3 ml (7,50 mmol) Triethylorthoformiat hinzugefügt. Die Mischung wurde 18 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und die Mischung 15 min gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt, unter vermindertem Druck eingengt und säulenchromatographisch (Dichlormethan : Isopropanol 95 : 5) grob getrennt.²³³

Ausbeute: 93,1 mg (76 %) (Lit.: 66 %)¹⁹⁸

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,28$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 208 °C (Lit: 209 – 212 °C)²⁷⁶

Leicht löslich in: DMSO, Dichlormethan, Chloroform

Schwer löslich in: Wasser, Ethanol, Methanol

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,32 (s, 3H, CH₃); 1,54 (s, 3H, CH₃); 3,51 – 3,57 (m, 2H, 2 x H-5'); 4,20 (td, 1H, ³*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 4,8 Hz, H-4'); 4,95 (dd, 1H, ³*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 6,2 Hz, H-3'); 5,19 (t, 1H, ³*J* = 5,5 Hz, 5'-OH); 5,33 (dd, 2H, ³*J* = 3,1 Hz, ³*J* = 6,2 Hz, H-2'); 6,11 (d, 1H, ³*J* = 3,1 Hz, H-1'); 7,30 (s, 2H, NH₂), 8,14 (s, 1H, H-2); 8,32 (s, 1H, H-8)

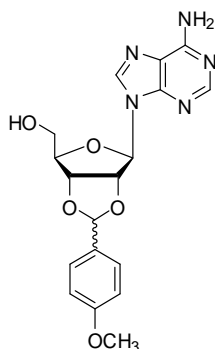
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): 25,34 (CH₃); 27,22 (CH₃); 61,73 (C-5'); 81,49; 83,38 und 86,51 (C-4', C-3' und C-2'); 89,75 (C-1'); 113,19 (O-C-O); 119,26 (C-5); 139,81 (C-8); 148,97 (C-4); 152,75 (C-2); 156,27 (C-6)

ESI-MS: 306,25 ([M-H]⁻); 308,22 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 88,2 %

Elementaranalyse: (C₁₃H₁₇N₅O₄ • Isoprop): N: 18,91 % (theoret.: 19,06 %); C: 52,36 % (52,31 %); H: 6,213 % (6,86 %); C/N: 2,779 (2,744)

6.4.6.2 Darstellung von 2',3'-*O*-*p*-Methoxybenzylidenadenosin (45, KL6)^{201,202}



Methode A:

267 mg Adenosin (**1**) wurden mit 2 ml trockenem *N,N*-Dimethylformamid, 0,3 ml (2,00 mmol) *p*-Anisaldehyd Dimethylacetal und 2 mg *p*-Toluensulfonsäure nach Vorschrift C umgesetzt. Zum Beenden der Reaktion wurden 20 mg Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Die Extraktion erfolgte zweimal mit je 50 ml Diethylether. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5) aufgereinigt und anschließend im Vakuum getrocknet.²⁰¹

Ausbeute: 80 mg (21 %) (Lit.: 93 %)²⁰¹

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,34$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 199 °C (Lit.: 196-199 °C)²⁷⁷

Leicht löslich in: DMSO, Mischungen aus Dichlormethan und Ethanol

Schwer löslich in: Dichlormethan, Ethanol, Methanol, Ethylacetat, Wasser

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,52 – 3,60 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,78 (s, 3H, O-CH₃); 4,36 (td, 1H, ³*J* = 2,4 Hz, ³*J* = 5,0 Hz, H-4'); 5,05 (dd, 1H, ³*J* = 2,4 Hz, ³*J* = 6,5 Hz, H-3'); 5,21 (t, 1H, ³*J* = 5,4 Hz, 5'-OH); 5,47 (dd, 2H, ³*J* = 2,9 Hz, ³*J* = 6,5 Hz, H-2'); 5,97 (s, 1H, O-CH-O); 6,28 (d, 1H, ³*J* = 2,9 Hz, H-1'); 6,99 (dd, 2H, ⁴*J* = 2,0 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, 2 x H_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,31 (s, 2H, NH₂); 7,49 (dd, 2H, ⁴*J* = 2,0 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, 2 x H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 8,15 (s, 1H, H-2); 8,36 (s, 1H, H-8)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 55,35 (O-CH₃); 63,42 (C-5'); 82,81; 83,69 und 85,70 (C-4', C-3' und C-2'); 94,12 (C-1'); 107,65 (O-CH-O); 114,06 (C_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 121,20 (C-5); 128,02 (C_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 131,98 (C_{ipso} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 140,39 (C-8); 148,47 (C-4); 152,69 (C-2); 155,92 (C-6); 160,90 (C_{para} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

Elementaranalyse: (C₁₈H₁₉N₅O₅ • 0,75 EtOAc): N: 16,14 % (theoret.: 16,68 %); C: 54,61 % (55,77 %); H: 4,988 % (5,64 %); C / N: 3,384 (3,344)

Methode B:

100 mg Adenosin (**1**) wurden nach Vorschrift D umgesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5) aufgereinigt und anschließend im Vakuum getrocknet.²⁰²

Ausbeute: 142 mg (98 %) (Lit.: 90 %)²⁰² eines 1 : 1-Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren (siehe Abbildung 6.1)

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,34$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 197°C (Lit.: 196-199°C)²⁷⁷

Leicht löslich in: DMSO, Mischungen aus Dichlormethan und Ethanol

Schwer löslich in: Dichlormethan, Ethanol, Methanol, Ethylacetat

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,54 - 3,62 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,76 (s, 1,5H, O-CH_{3,exo}); 3,78 (s, 1,5H, O-CH_{3,endo}); 4,26 (dd; 0,5H, ³*J* = 5,0 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, H-4'_{exo}); 4,36 (td, 1H, ³*J* = 2,4 Hz, ³*J* = 5,0 Hz, H-4'_{endo}); 5,05 - 5,07 (m, 1H, H-3'); 5,10 (t, 0,5H, ³*J* = 5,6 Hz, 5'-OH_{exo}); 5,22 (t, 0,5H, ³*J* = 5,6 Hz, 5'-OH_{endo}); 5,46 (pseudo-td, 1H, ³*J* = 3,0 Hz, ³*J* = 6,5 Hz, H-2'); 5,97 (s, 0,5H, O-CH-O_{endo}); 6,18 (s, 0,5H, O-CH-O_{exo}); 6,26 (d, 0,5H, ³*J* = 3,2 Hz, H-1'_{exo}); 6,28 (d, 0,5H, ³*J* = 2,9 Hz, H-1'_{endo}); 6,96 (dd, 1H, ⁴*J* = 2,1 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,00 (dd, 1H, ⁴*J* = 2,1 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,31 (s, 2H, NH₂), (dd, 1H, ⁴*J* = 2,1 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,49 (dd, 1H, ⁴*J* = 2,1 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 8,15 und 8,16 (2 x s, insg. 1H, H-2); 8,35 und 8,36 (2 x s, insg. 1H, H-8)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55,33 (O-CH_{3,exo}); 55,38 (O-CH_{3,endo}); 61,71 (C-5'); 80,64; 82,96 und 84,62 (C-4'_{exo}, C-3'_{exo} und C-2'_{exo}); 82,70; 83,81 und 86,43 (C-4'_{endo}, C-3'_{endo} und C-2'_{endo}); 88,15 (C-1'_{exo}); 89,65 (C-1'_{endo}); 103,04 (O-CH-O_{endo}); 106,71 (O-CH-O_{exo}); 113,82 und 113,95 (2 x C_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 119,22 (C-5); 128,27 und 128,38 (2 x C_{ipso} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,55 und 128,61 (2 x C_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 139,82 (C-8_{exo}); 139,98 (C-8_{endo}); 149,10 (C-4); 152,81 (C-2); 156,30 (C-6); 160,40 (C_{para} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings_{exo}); 160,54 (C_{para} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings_{endo})

ESI-MS: 384,1 ([M-H]⁻); 386,6 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 99,3 %

Elementaranalyse: (C₁₈H₁₉N₅O₅ • 0,75 EtOH): N: 15,87 % (theoret.: 16,68 %); C: 56,11 % (55,77 %); H: 5,437 % (5,64 %); C / N: 3,536 (3,344)

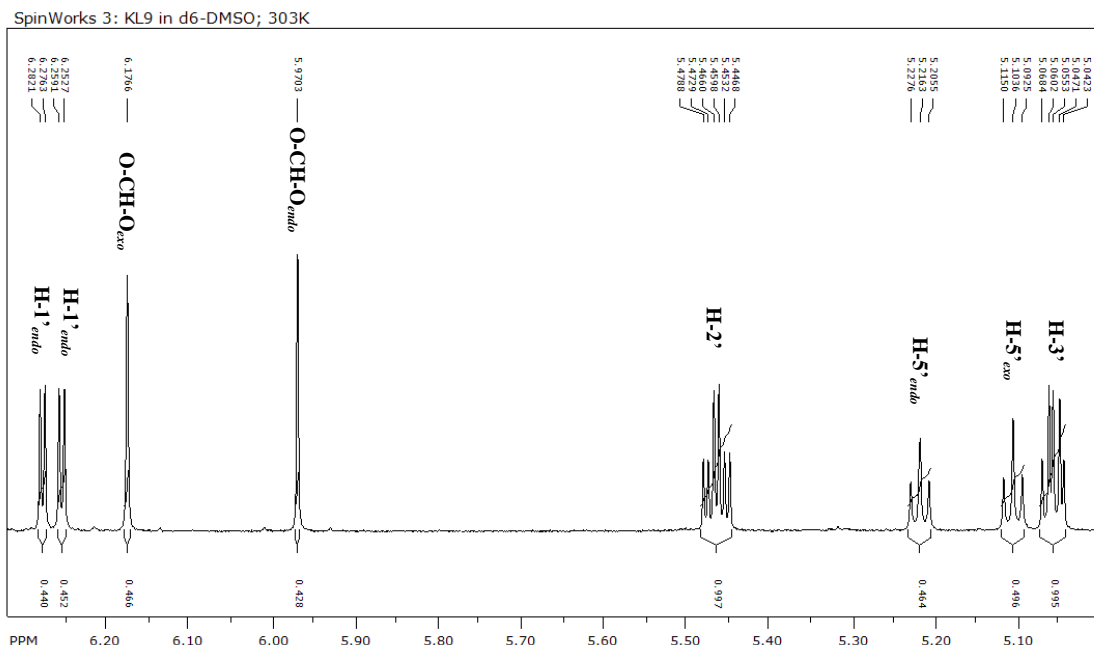
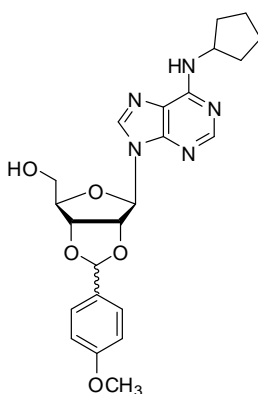


Abbildung 6.1: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum der Verbindung 45.

6.4.6.3 Darstellung von N^6 -Cyclopentyl-2',3'- O - p -methoxybenzylidenadenosin (46, KL10)



100 mg (0,30 mmol) N^6 -Cyclopentyladenosin (**3**) wurden nach Vorschrift D mit 2,0 ml p -Anisaldehyd geschützt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5). Das Produkt wurde anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 97 mg (72 %) eines ca. 65 : 35-Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren (siehe Abbildung 6.2)

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,55$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 78-82 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Diethylether, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,53 – 1,58 (br, insg. 4H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,70 – 1,71 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,93 – 1,95 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 3,53 – 3,61 (m, insg. 2H, 2 x H-5'); 3,76 (s, 2H, O- $\text{CH}_{3,exo}$); 3,78 (s, 1H, O- $\text{CH}_{3,endo}$); 4,27 (dd; 0,62H, $^3J = 4,7$ Hz, $^3J = 9,2$ Hz, H-4' $_{exo}$); 4,36 (td, 0,48H, $^3J = 2,4$ Hz, $^3J = 4,9$ Hz, H-4' $_{endo}$); 4,45 – 4,59 (br, 1H, N^6 -CH); 5,05 – 5,07 (m, 1H, H-3'); 5,10 (t, 0,63H, $^3J = 5,6$ Hz, 5'-OH $_{exo}$); 5,22 (t, 0,46H, $^3J = 5,6$ Hz, 5'-OH $_{endo}$); 5,46 (pseudo-td, 1H, $^3J = 3,0$ Hz, $^3J = 6,6$ Hz, H-2'); 5,97 (s, 0,45H, O-CH-O $_{endo}$); 6,17 (s, 0,55H, O-CH-O $_{exo}$); 6,26 (d, 0,55H, $^3J = 3,0$ Hz, H-1' $_{exo}$); 6,28 (d, 0,45H, $^3J = 2,7$ Hz, H-1' $_{endo}$); 6,96 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, H_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,00 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, H_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,43 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,49 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,72 – 7,73 (br, 1H, NH); 8,21 (2 x s, insg. 1H, H-2); 8,35 und 8,36 (2 x s, insg. 1H, H-8)

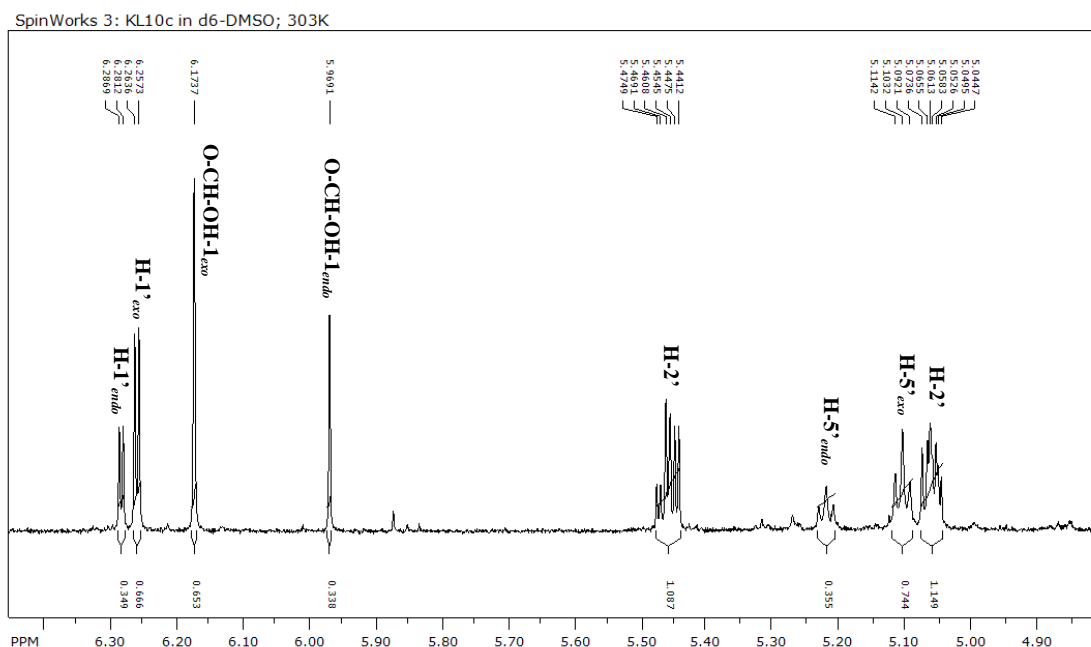


Abbildung 6.2: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum der Verbindung 46.

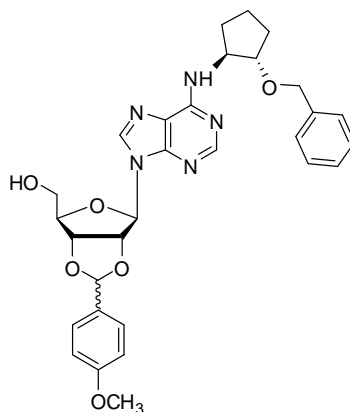
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 23,66 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 33,28 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 52,34 (N^6 -CH); 55,32 (O- $\text{CH}_{3,exo}$); 55,36 (O- $\text{CH}_{3,endo}$); 63,13 und 63,44 (C-5'); 80,26 – 86,19 (6 Signale, C-4', C-3' und C-2', je *exo* und *endo*); 92,02 (C-1' $_{exo}$); 94,17 (C-1' $_{endo}$); 104,66 (O-CH-O $_{endo}$); 107,57 (O-CH-O $_{exo}$); 113,97 und 114,02 (2 x C_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 121,14 (C-5); 127,74 und 128,02 (C_{ipso} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,98 und 128,65 (2 x C_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 139,03 (C-8 $_{exo}$); 139,35 (C-8 $_{endo}$); 147,25 (C-4); 153,00 (C-2); 154,89 (C-6); 160,66 (C_{para} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings $_{exo}$); 160,86 (C_{para} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings $_{endo}$)

ESI-MS: 452,1 ($[M-H]^-$); 454,3 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,1 %

Elementaranalyse: ($C_{23}H_{27}N_5O_5 \cdot 0,5 \text{ EtOH}$): N: 14,35 % (theoret.: 14,70 %); C: 60,55 % (60,49 %); H: 5,93 % (6,35 %); C / N: 4,22 (4,115)

6.4.6.4 Darstellung von N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (87, KL114)



400 mg (0,91 mmol) N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzoyloxy)cyclopentyladenosin (**81**) wurden mit 8 ml trockenem *N,N*-Dimethylformamid, 0,3 ml (1,81 mmol) *p*-Methoxybenzaldehyd Dimethylacetal und 8 mg *p*-Toluensulfonsäure nach Vorschrift C umgesetzt. Zum Beenden der Reaktion wurden 24 mg Natriumhydrogencarbonat dazugegeben. Die Extraktion erfolgte mit zweimal 100 ml Diethylether. Da eine vollständige Reinheit der Substanz auch mit mehrmaliger Säulenchromatographie und Umkristallisieren nicht erzielt werden konnte, wurde das Produkt ohne ausführliche Analytik weiterverwendet.

Ausbeute: 312 mg (62 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,66$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

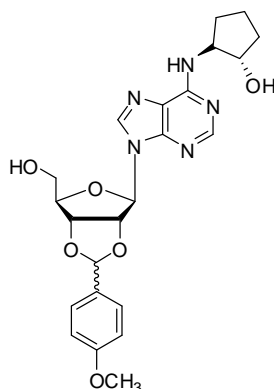
Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, Petrolether, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

ESI-MS: 558,3 ($[M-H]^-$); 560,3 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 73,6 %

6.4.6.5 Darstellung von N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (94, KL129)



780 mg (2,21 mmol) N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyladenosin (**12**) wurden mit 10 ml trockenem *N,N*-Dimethylformamid, 0,8 ml (4,43 mmol) *p*-Methoxybenzaldehyd Dimethylacetal und 10 mg *p*-Toluensulfonsäure nach modifizierter Vorschrift C umgesetzt. Zum Beenden der Reaktion wurden 20 mg Natriumhydrogencarbonat dazugegeben. Die Extraktion erfolgte zweimal mit je 50 ml Diethylether und einmal mit 50 ml Ethylacetat. Beim Eindampfen der organischen Phasen fiel ein Niederschlag aus, der abfiltriert und getrocknet wurde. Der Überstand wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 85 : 15) aufgereinigt. Die wässrige Phase wurde anschließend erneut mit 50 ml *n*-Heptan extrahiert. Diese zweite organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 610 mg (49 %) eines ca. 1 : 9 – Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren (siehe Abbildung 6.3)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,42$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 87 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Petrolether

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1,68 – 1,75 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,84 – 1,93 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,05 – 2,11 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,29 – 2,35 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 3,79 (dd, 1H, $^3J = 4,0$ Hz, $^2J = 12,1$ Hz, H-5'); 3,86 (dd überlagert von s, insg. 4H, $^3J = 3,4$ Hz, H-5' und O- CH_3); 4,16 (dd, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, $^3J = 11,7$ Hz, Cyclopentyl-CH-O); 4,28 – 4,39 (br, 1H, N^6 -CH); 4,58 (dd, 1H, $^3J = 3,8$ Hz, $^3J = 5,6$ Hz, H-4'); 5,17 (dd, 1H, $^3J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,6$ Hz, H-3'); 5,44 (dd, 1H, $^3J = 3,3$ Hz, $^3J = 6,5$ Hz, H-2'); 6,03 (s, 0,9H, O-CH-O_{endo}); 6,22 (s, 0,1H, O-CH-O_{exo}); 6,34 (d, 0,1H, $^3J = 3,3$ Hz, H-1'_{exo}); 6,35 (d, 0,9H,

$^3J = 3,3$ Hz, H-1'_{endo}); 6,98 (dd, 0,2H, $^4J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,02 (dd, 1,8H, $^4J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,48 (dd, 0,2H, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,56 (dd, 1,8H, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 8,31 (s, 1H, H-8); 8,36 (s, 1H, H-2); (3 Signale (NH, 5'-OH und Cyclopentyl-CH-OH) nicht detektierbar)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,62–1,66 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,73–1,77 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,83–1,88 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,09–2,11 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,27–2,29 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 3,79 (dd, 0,9H, $^3J = 1,2$ Hz, $^2J = 11,8$ Hz, H-5'_{endo}); 3,79 (s, 0,3H, O-CH_{3,exo}); 3,83 (s, 2,7H, O-CH_{3,endo}); 3,87 (d, 0,1H, $^3J = 2,2$ Hz, H-5'_{exo}); 3,97 (d, 1H, $^2J = 12,8$ Hz, H-5'); 4,02–4,09 (br, insg. 2H, N⁶-CH und H-4'); 4,67 (d, 1H, $^3J = 0,7$ Hz, H-2'); 5,18 (dd, 1H, $^3J = 0,7$ Hz, $^3J = 6,2$ Hz, H-3'); 5,26–5,30 (m, 1H, Cyclopentyl-CH-O); 5,69 (s, 1H, OH); 5,96 (d, 0,9H, $^3J = 4,9$ Hz, H-1'_{endo}); 6,00 (d überlagert von s, insg. 1H, O-CH-O_{endo} und H-1'_{exo}); 6,10 (s, 1H, OH); 6,23 (s, 0,1H, O-CH-O_{exo}); 6,48 (s, 1H, NH); 6,89 (dd, 0,2H, $^4J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 6,95 (dd, 1,8H, $^4J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,36 (dd, 0,2H, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,47 (dd, 1,8H, $^3J = 6,7$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,76 (s, 1H, H-8); 8,30 (s, 1H, H-2)

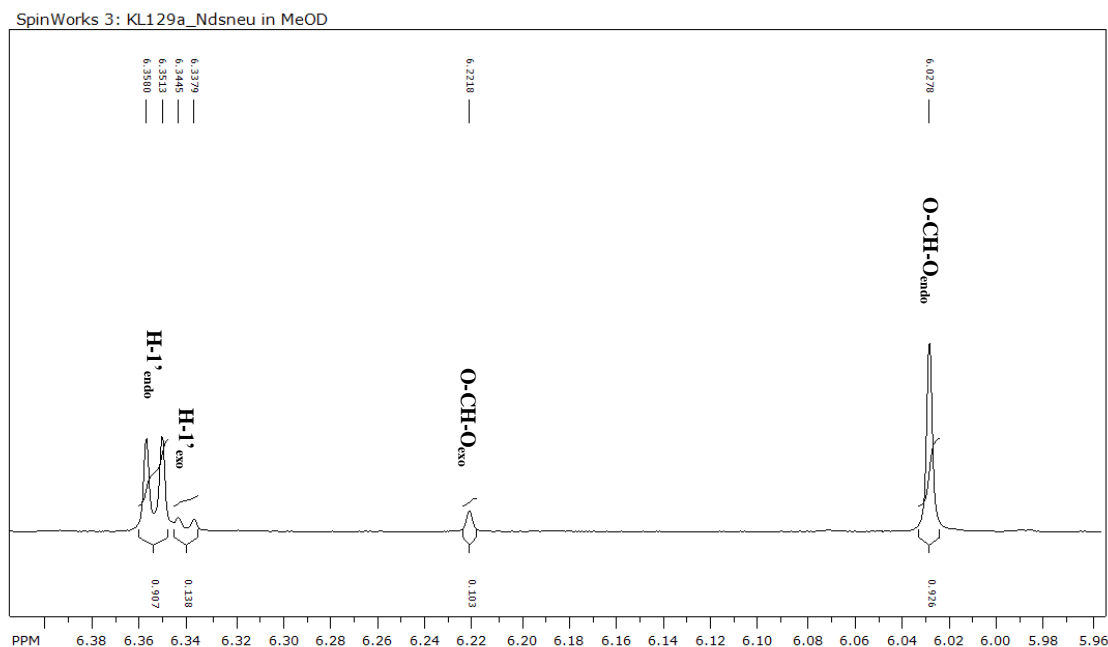


Abbildung 6.3: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum der Verbindung 94.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 21,59 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 31,35 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 32,96 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 55,31 (O-CH_{3,exo}); 55,35 (O-CH_{3,endo}); 62,15 (N⁶-CH); 63,04 (C-5'_{exo}); 63,36 (C-5'_{endo}); 79,43 (C-4'_{endo}); 80,24 (C-4'_{exo}); 82,79 (Cyclopentyl-CH-OH); 83,66 (C-3'_{endo}); 83,87 (C-3'_{exo});

85,67 (C-2'_{endo}); 86,14 (C-2'_{exo}); 91,92 (C-1'_{exo}); 94,07 (C-1'_{endo}); 104,70 (O-CH-O_{exo}); 107,62 (O-CH-O_{endo}); 113,91 (C_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 114,02 (C_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 121,32 (C-5); 127,73 (C_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,90 (C_{ipso} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,99 (C_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 139,93 (C-8); 147,24 (C-4); 152,43 (C-2); 155,46 (C-6); 160,68 (C_{para,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 160,87 (C_{para,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

ESI-MS: 468,4 ([M-H]⁻); 470,4 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 85,9 %

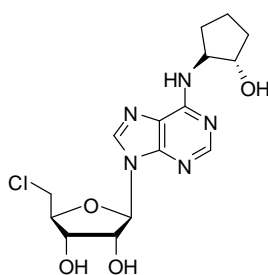
Elementaranalyse: (C₂₃H₂₇N₅O₆ • 0,5 H₂O): N: 13,42 % (theoret.: 14,64 %); C: 57,61 % (57,73 %); H: 5,979 % (5,90 %); C / N: 4,293 (3,943)

6.4.7 KATALYTISCHE HYDRIERUNG

Vorschrift E:

Ein Äquivalent des geschützten Adenosin-Derivates wurde in 3–10 ml Methanol gelöst, mit einem Äquivalent Palladiumhydroxid auf Aktivkohle (Pearlman's Katalysator) versetzt und bei 55 psi und Raumtemperatur in der unten angegebenen Zeit hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über eine Celite-Schicht filtriert und der Filterkuchen wurde mehrmals mit Methanol ausgewaschen. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde wie angegeben aufgereinigt.²²⁵

6.4.7.1 Darstellung von N⁶-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (**84**, KL95)



102 mg (0,22 mmol) N⁶-(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyl-5'-chlor-5'-desoxyadenosin (**83**) wurden nach Vorschrift E drei Tage hydriert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 90 : 10) aufgereinigt.

Ausbeute: 78 mg (97 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: R_f = 0,26 (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 146 °C

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Petrolether, Hexan, Heptan

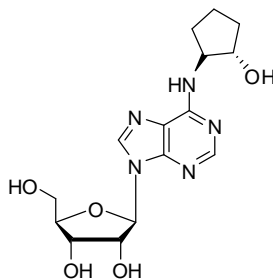
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,74–1,77 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,80–1,89 (br, insg. 3H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,29–2,32 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 3,29–3,50 (m, insg. 3H, H-5', N^6 -CH und Cyclopentyl- CH-O); 3,64–3,68 (m, 1H, H-4'); 3,82 (dd, 1H, $^3J = 3,2$ Hz, $^2J = 12,2$ Hz, H-5'); 3,89–3,92 (br, 1H, OH); 4,16–4,18 (br, 1H, OH); 4,44 (pseudo-t, 1H, $^3J = 4,1$ Hz, $^3J = 5,1$ Hz, H-3'); 4,49 (pseudo-q, 1H, $^3J = 3,6$ Hz, OH); 4,61 (pseudo-t, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, H-2'); 6,08 (d, 1H, $^3J = 4,9$ Hz, H-1'); 8,24 (s, 1H, H-2); 8,33 (s, 1H, H-8); (1 Signal (NH) nicht detektierbar)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 22,63 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 31,18 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 33,19 ($\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 44,33 (C-5'); 64,17 (N^6 -CH); 71,50 (C-2'); 75,45 (C-3'); 79,06 (Cyclopentyl- CH-O); 84,31 (C-4'); 89,95 (C-1'); 118,90 (C-5); 140,66 (C-8); 145,34 (C-2); 149,12 (C-4); 150,12 (C-6)

ESI-MS: 368,0 ($[\text{M-H}]^-$); 370,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 97 %

6.4.7.2 Darstellung von N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Hydroxy)cyclopentyladenosin (**12**, KL127, GR79236)²¹⁴



100 mg (0,23 mmol) N^6 -(1*S*,2*S*)-2-(Benzyloxy)cyclopentyladenosin (**81**) wurden nach Vorschrift E sieben Tage hydriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 85 : 15) aufgereinigt und anschließend aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 59 mg (74 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,42$ (15 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 44 °C (nach Umkristallisation aus Methanol)

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Petrolether, Wasser, Hexan

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1,67–1,75 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,83–1,93 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,05–2,11 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,29–2,35 (br, 1H,

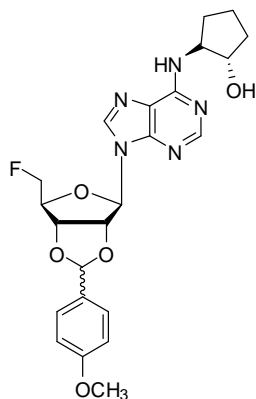
CH₂(Cyclopentyl)); 3,79 (dd, 1H, ³J = 2,7 Hz, ²J = 12,5 Hz, H-5'); 3,93 (dd, 1H, ³J = 2,7 Hz, ²J = 12,6 Hz, H-5'); 4,16 (dd, 1H, ³J = 5,2 Hz, ³J = 11,7 Hz, N⁶-CH); 4,21 (dd, 1H, ³J = 2,5 Hz, ³J = 5,1 Hz, H-4'); 4,32 (br, 1H, Cyclopentyl-CH-OH); 4,36 (dd, 1H, ³J = 2,6 Hz, ³J = 5,1 Hz, H-3'); 4,78 (dd, 1H, ³J = 5,2 Hz, ³J = 6,3 Hz, H-2'); 6,00 (d, 1H, ³J = 6,4 Hz, H-1'); 8,28 (s, 1H, H-2); 8,32 (s, 1H, H-8); (3 Signale (NH, 5'-OH, Cyclopentyl-CH-OH) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 22,29 (CH₂(Cyclopentyl)); 31,40 (CH₂(Cyclopentyl)); 33,53 (CH₂(Cyclopentyl)); 61,40 (C-5'); 63,77 (N⁶-CH); 72,96 (C-3'); 75,77 (C-2'); 79,38 (Cyclopentyl-CH-OH); 88,49 (C-4'); 91,58 (C-1'); 121,62 (C-5); 141,84 (C-8); 149,47 (C-4); 153,72 (C-2); 156,57 (C-6)

ESI-MS: 350,3 ([M-H]⁻); 352,2 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 100 %

6.4.7.3 Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-N⁶-((1S,2S)-2-hydroxy)cyclopentyl-2',3'-O-p-methoxybenzylidenadenosin (90, KL135)



90,2 mg (0,16 mmol) N⁶-((1S,2S)-2-Benzyloxy)cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-O-p-methoxybenzylidenadenosin (**89**) wurden nach modifizierter Vorschrift E mit 60 mg Palladiumhydroxid auf Aktivkohle (Pearlman's Katalysator) acht Tage hydriert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 20 : 80) aufgereinigt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 28 mg (37 %) eines 1 : 1 – Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: R_f = 0,38 (20 % Petrolether in Ethylacetat)

Smp.: 63 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Petrolether

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,60–1,69 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,73–1,79 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,82–1,89 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 2,07–2,15 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 2,24–2,32 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 3,80 (s, 1,5H, O-CH_{3,exo}); 3,82 (s, 1,5H, O-CH_{3,endo}); 4,00–4,10 (dd überlagert von br, insg. 2H, ³J = 0,7 Hz, ³J = 6,7 Hz, Cyclopentyl-CH-OH und N⁶-CH); 4,54–4,72 (m, insg. 4H, 2 x H-5', OH, H-4'); 5,17 (dd, 0,5H, ³J = 2,5 Hz, ³J = 6,5 Hz, H-3'); 5,26 (dd, 0,5H, ³J = 3,6 Hz, ³J = 6,1 Hz, H-3'); 5,47 (d, 0,5H, ³J = 5,8 Hz, H-2'); 5,54 (d, 0,5H, ³J = 4,1 Hz, H-2'); 5,97–6,03 (s überlagert von br, insg. 1,5H, O-CH-O_{endo} und NH); 6,15 (s, 0,5H, O-CH-O_{exo}); 6,24 (s, 0,5H, H-1'_{exo}); 6,31 (s, 0,5H, H-1'_{endo}); 6,91 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 6,94 (d, 1H, ³J = 8,3 Hz, H_{meta} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,41 (d, 1H, ³J = 8,5 Hz, H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,47 (d, 1H, ³J = 8,5 Hz, H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,90 (s, 1H, H-8); 8,33 (s, 1H, H-2)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21,62 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 31,46 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 33,04 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 55,33 (s, O-CH_{3,exo}); (s, O-CH_{3,endo}); 62,31 (s, N⁶-CH); 79,53 (s, Cyclopentyl-CH-OH); 80,51 (d, ³J_{FC} = 7,2 Hz, C-3'_{exo}); 81,58 (d, ³J_{FC} = 6,7 Hz, C-3'_{endo}); 82,12 (d, ¹J_{FC} = 172,0 Hz, C-5'_{exo}); 83,49 (d, ¹J_{FC} = 172,5 Hz, C-5'_{endo}); 83,91 (s, C-2'_{exo}); 84,08 (d, ²J_{FC} = 19,2 Hz, C-4'_{exo}); 85,00 (s, C-2'_{endo}); 85,60 (d, ²J_{FC} = 19,5 Hz, C-4'_{endo}); 90,35 (s, C-1'_{endo}); 90,70 (s, C-1'_{exo}); 104,55 (s, O-CH-O_{exo}); 107,90 (s, O-CH-O_{endo}); 113,93 (s, C_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 113,99 (s, C_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,41 (s, C_{ipso,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,55 (s, C_{ipso,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,13 (s, C_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,26 (s, C_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 137,87 (s, C-8); 148,32 (s, C-4); 152,79 (s, C-2); 155,10 (s, C-6); 160,90 (C_{para,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 161,02 (C_{para,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); (1 Signal (C-5) nicht detektierbar)

ESI-MS: 470,45 ([M-H]⁻); 472,44 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 96,9 %

Elementaranalyse: (C₂₃H₂₆FN₅O₅ • EtOAc): N: 12,58 % (theoret.: 12,52 %); C: 58,50 % (57,95 %); H: 6,418 % (6,12 %); C / N: 4,650 (4,629)

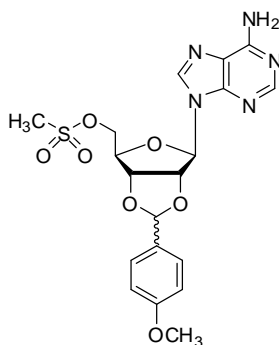
6.4.8 EINFÜHRUNG DER ABGANGSGRUPPE

Vorschrift F:

Ein Äquivalent des 2',3'-*O*-geschützten Adenosin-Derivates wurden unter Argon-Atmosphäre in 15 ml Dichlormethan suspendiert und auf –5 °C gekühlt. Es wurden 2,2 Äquivalente Lutidin tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde anschließend 15 min bei –5 °C gerührt. Dann wurden zwei Äquivalente des jeweiligen Sulfonsäurechlorids tropfenweise zugegeben, sodass die

Temperatur 0 °C nicht überstieg. Anschließend wurde die Reaktion 50 min bis eine Stunde im Eisbad und danach bis zur vollständigen Reaktion bei Raumtemperatur gerührt. Nach Bedarf wurden nochmals je ein Äquivalent Lutidin und Sulfonsäurechlorid tropfenweise zugegeben. Nach dem Ende der Reaktion wurde die organische Phase nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte jeweils wie unten angegeben.

6.4.8.1 Darstellung von 5'-Mesyl-2',3'-O-*p*-methoxybenzylidenadenosin (48, KL37)



101 mg (0,26 mmol) 2',3'-O-*p*-Methoxybenzylidenadenosin (**45**) wurden nach modifizierter Vorschrift F mit 60 mg (0,52 mmol) Methansulfonsäurechlorid umgesetzt. Die Lösung wurde 50 min im Eisbad und anschließend eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Nach drei Tagen wurden nochmals 14,9 mg (0,13 mmol) Lutidin und 13,9 mg (0,13 mmol) Methansulfonsäurechlorid hinzugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5). Aufgrund der raschen Zersetzung des Produktes sollte auf eine möglichst schnelle Aufarbeitung des Produktes geachtet werden.

Ausbeute: 76 mg (63 %) eines 1 : 1,2 – Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,62$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2,88 (s, 1,6H, S- CH_3 ,*endo*); 2,90 (s, 1,4H, S- CH_3 ,*exo*); 3,80 (s, 1,4H, O- CH_3 ,*exo*); 3,82 (s, 1,6H, O- CH_3 ,*endo*); 4,39 – 4,54 (m, insg. 2H, H-4' und H-5'); 4,58 – 4,60 (m, 0,5H, H-5'); 4,68 – 4,69 (m, 0,6H, H-5'); 5,25 (dd, 0,55H, $^3J = 3,0$ Hz, $^3J = 6,6$ Hz, H-3'*endo*); 5,35 (dd, 0,48H, $^3J = 3,7$ Hz, $^3J = 6,2$ Hz, H-3'*exo*); 5,54 (dd, 0,48H, $^3J = 2,0$ Hz, $^3J = 6,3$ Hz, H-2'*exo*); 5,63 (dd, 0,56H, $^3J = 1,8$ Hz, $^3J = 6,6$ Hz, H-2'*endo*); 5,77 (s; 2H; NH_2); 5,98 (s, 0,49H, O-CH-O*endo*); 6,13 (s, 0,42H, O-CH-O*exo*); 6,18 (d, 0,42H, $^3J = 1,9$ Hz, H-1'*exo*); 6,24 (d, 0,51H,

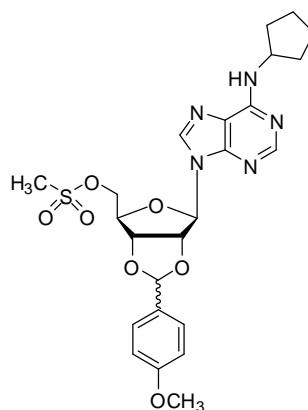
$^3J = 1,7$ Hz, H-1'_{endo}); 6,91 (dd, 0,5H, $^4J = 1,8$ Hz, $^3J = 8,8$ Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 6,94 (dd, 0,6H, $^4J = 1,8$ Hz, $^3J = 8,8$ Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,40 (dd, 0,5H, $^4J = 1,8$ Hz, $^3J = 8,7$ Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,46 (dd, 0,6H, $^4J = 1,8$ Hz, $^3J = 8,7$ Hz, H_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,89 (s, 1H, H-2); 8,34 (s, 1H, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 37,57 (S-CH_{3,endo}); 37,61 (S-CH_{3,exo}); 55,33 (O-CH_{3,exo}); 55,37 (O-CH_{3,endo}); 68,24 (C-5'_{endo}); 68,46 (C-5'_{exo}); 81,33 (C-4'_{exo}); 82,09 (C-4'_{endo}); 83,11 (C-3'_{endo}); 83,45 (C-3'_{exo}); 84,63 (C-2'_{endo}); 84,82 (C-2'_{exo}); 90,53 (C-1'); 104,60 (O-CH-O_{exo}); 107,93 (O-CH-O_{endo}); 113,94 (C_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 114,00 (C_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 120,30 (C-5); 127,30 (C_{ipso,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,40 (C_{ipso,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,14 (C_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,22 (C_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 140,05 (C-8); 149,11 (C-4); 153,28 (C-2); 155,65 (C-6); 160,94 (C_{para,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 161,04 (C_{para,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

ESI-MS: 462,0 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); 464,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 97,0 %

6.4.8.2 Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (50, KL46)



30 mg (0,07 mmol) *N*⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**46**) wurden nach modifizierter Vorschrift F mit 15,2 mg (0,13 mmol) Methansulfonsäurechlorid umgesetzt. Die Lösung wurde eine Stunde im Eisbad und anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Hälfte der Zeit wurden nochmals 14,9 mg (0,13 mmol) Lutidin und 13,9 mg (0,13 mmol) Methansulfonsäurechlorid hinzugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5). Da die Verbindung eine sehr schnelle Zersetzung zeigte, wurde sie sofort fluoriert.

Ausbeute: 16 mg (47 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,38$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

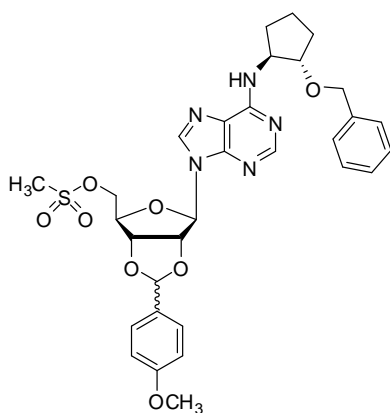
Leicht löslich in: Dichlormethan

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

ESI-MS: 530,2 ($[M-H]^-$); 532,5 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 93 %

6.4.8.3 Darstellung von N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**88**, KL120)



55,3 mg (0,10 mmol) N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**87**) wurden nach Vorschrift F mit 22,6 mg (0,20 mmol) Methansulfonsäurechlorid in 10 ml Dichlormethan umgesetzt. Die Lösung wurde eine Stunde im Eisbad und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 93 : 7). Da die Verbindung eine sehr schnelle Zersetzung zeigte, wurde sie sofort fluoriert.

Ausbeute: 37 mg (65 %) eines 1 : 1,2-Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,48$ und $0,72$ (7 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,54 – 1,60 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,73 – 1,80 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,91 – 1,98 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,27 – 2,33 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,86 (s, 1,6H, S- $\text{CH}_3_{\text{endo}}$); 2,88 (s, 1,3H, S- CH_3_{exo}); 3,79 (s, 1,3H, O- CH_3_{exo}); 3,81 (s, 1,6H, O- $\text{CH}_3_{\text{endo}}$); 3,91 – 3,95 (br, 1H, Cyclopentyl- $\underline{\text{CH}}$ -O-); 4,39 – 4,52 (m, insg. 2H, 2 x H-5'); 4,61 – 4,70 (m, insg. 4H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $N^6\text{-CH}$ und H-4'); 5,25 (dd, 0,56H,

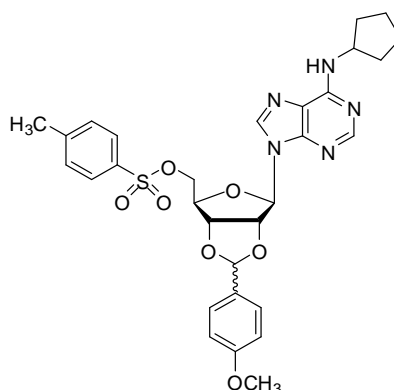
$^3J = 3,0$ Hz, $^3J = 6,6$ Hz, H-3'_{endo}); 5,34 (dd, 0,46H, $^3J = 3,7$ Hz, $^3J = 6,3$ Hz, H-3'_{exo}); 5,53 (dd, 0,46H, $^3J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,3$ Hz, H-2'_{exo}); 5,61 (dd, 0,56H, $^3J = 1,8$ Hz, $^3J = 6,6$ Hz, H-2'_{endo}); 5,97 (s, 0,56H, O-CH-O_{endo}); 6,12 (s, 0,46H, O-CH-O_{exo}); 6,16 (d, 0,46H, $^3J = 2,2$ Hz, H-1'_{exo}); 6,22 (d, 0,56H, $^3J = 1,8$ Hz, H-1'_{endo}); 6,90 (dd, 0,95H, $^4J = 2,1$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 6,93 (dd, 1,15H, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J = 6,8$ Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,22 – 7,29 (m, insg. 5H, 5 x H_{arom}); 7,39 (dd, 0,95H, $^4J = 1,8$ Hz, $^3J = 6,9$ Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,45 (dd, 1,15H, $^4J = 1,9$ Hz, $^3J = 6,8$ Hz, H_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,82 (s, 1H, H-2); 8,37 (s, 1H, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃): δ 21,51 (CH₂(Cyclopentyl)); 30,32 (CH₂(Cyclopentyl)); 30,82 (CH₂(Cyclopentyl)); 37,48 (S-CH_{3,endo}); 37,53 (S-CH_{3,exo}); 55,29 (O-CH_{3,exo}); 55,31 (O-CH_{3,endo}); 58,28 (N⁶-CH); 66,20 (Cyclopentyl-CH-O); 68,30 (C-5'_{endo}); 68,52 (C-5'_{exo}); 71,12 (CH₂-Ph); 81,33 (C-4'_{exo}); 82,09 (C-4'_{endo}); 83,04 (C-3'_{exo}); 83,43 (C-3'_{endo}); 84,64 (C-2'_{endo}); 84,73 (C-2'_{exo}); 84,79 (C-1'_{exo}); 90,47 (C-1'_{endo}); 104,49 (O-CH-O_{exo}); 107,85 (O-CH-O_{endo}); 113,89 (C_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 113,94 (C_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 120,30 (C-5); 127,39 - 128,25 (5 Signale, 5 x C_{arom}); 138,66 (CH₂-CH_{arom}); 139,15 (C-8); 148,05 (C-4); 153,32 (C-2); 154,47 (C-6); 160,88 (C_{para,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 160,98 (C_{para,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

ESI-MS: 636,6 ([M-H]⁻); 638,4 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 66,3 %

6.4.8.4 Darstellung von N⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzyliden-5'-tosyladenosin (58, KL56)



30 mg (0,07 mmol) N⁶-Cyclopentyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**46**) wurden nach Vorschrift F mit 25,0 mg (0,13 mmol) *p*-Toluensulfonsäurechlorid umgesetzt. Die Lösung wurde eine Stunde im Eisbad und anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden nochmals 21,3 mg (0,21 mmol) Lutidin und 37,9 mg (0,21 mmol) *p*-Toluensulfonsäurechlorid hinzugegeben. Die Reaktion wurde zwei weitere Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung

erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5). Da die Verbindung eine sehr schnelle Zersetzung zeigte wurde sie ohne vollständige Analytik sofort fluoriert.

Ausbeute: 8,1 mg (20 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,44$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Dichlormethan

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

ESI-MS (Startlaufmittel: 60 % H_2O :40 % MeOH mit 2mM NH_4OAc ; Endlaufmittel: 100 % MeOH mit 2mM NH_4OAc ; Gradientendauer: 30 min): 606,3 ($[M-H]^-$); 608,0 ($[M+H]^+$)

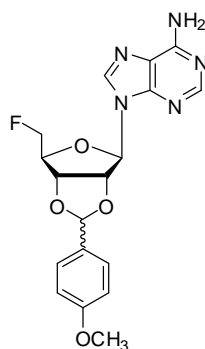
Reinheit laut ESI-MS: 96,8 %

6.4.9 FLUORIERUNG

Vorschrift G:

Ein Äquivalent des 2',3'-*O*-geschützten-5'-aktivierten Adenosin-Derivates wurden in 2,0 ml trockenem Dioxan in einem Mikrowellengefäß gelöst. Es wurden je zwei Äquivalente Tetrabutylammoniumdifluorid-Lösung (50 % in Acetonitril) und Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat sowie drei Tropfen trockenes Pyridin dazugegeben. Die Reaktion wurde in der Mikrowelle (15 bar, 130 °C, 150 W, 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Substanz wurde säulenchromatographisch entsprechend der unten angegebenen Bedingungen aufgereinigt.²⁰⁴

6.4.9.1 Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (49, KL38)



70,0 mg (0,15 mmol) 5'-Mesityl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) wurden nach Vorschrift G umgesetzt. Die Substanz wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5) grob gereinigt und direkt weiter verwendet.

Ausbeute: 26 mg (44 %) eines 1 : 1,6 - Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,27$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 148 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

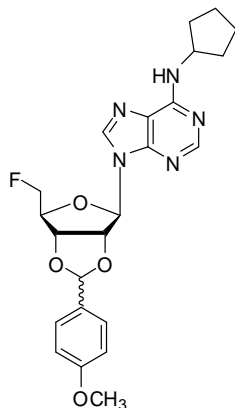
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 3,76 (s, 1,3H, $\text{O-CH}_{3,exo}$); 3,78 (s, 1,7H, $\text{O-CH}_{3,endo}$); 4,51–4,71 (m, insg. 3H, H-4' und 2 x H-5'); 5,15 (dd, 1H, $^3J = 2,5$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, H-3'); 5,51 (dd, 0,5H, $^3J = 2,9$ Hz, $^3J = 6,5$ Hz, H-2'_{exo}); 5,58 (dd, 0,7H, $^3J = 1,7$ Hz, $^3J = 6,5$ Hz, H-2'_{endo}); 6,00 (s, 0,7H, O-CH-O_{endo}); 6,22 (s, 0,4H, O-CH-O_{exo}); 6,33 (d, 0,4H, $^3J = 3,0$ Hz, H-1'_{exo}); 6,38 (d, 0,7H, $^3J = 2,1$ Hz, H-1'_{endo}); 6,97 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{meta,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,00 (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{meta,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,32 (s; 2H; NH_2); 7,43 (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz, H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,50 (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz, H_{ortho} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 8,17 (s, 1H, H-2); 8,31 (s; 1H, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 55,33 ($\text{O-CH}_{3,exo}$); 55,36 ($\text{O-CH}_{3,endo}$); 80,55 (d, $^3J_{FC} = 7,2$ Hz, C-3'_{exo}); 81,59 (d, $^3J_{FC} = 6,7$ Hz, C-3'_{endo}); 82,74 (d, $^1J_{FC} = 172,1$ Hz, C-5'); 82,84 (d, $^1J_{FC} = 172,6$ Hz, C-5'); 83,85 (C-2'_{exo}); 83,99 (d, $^2J_{FC} = 19,7$ Hz, C-4'_{exo}); 84,95 (C-2'_{endo}); 85,54 (d, $^2J_{FC} = 19,7$ Hz, C-4'_{endo}); 90,27 (C-1'_{exo}); 90,58 (C-1'_{endo}); 104,52 (O-CH-O_{exo}); 107,88 (O-CH-O_{endo}); 113,91 ($\text{C}_{meta,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 113,98 ($\text{C}_{meta,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 120,19 (C-5); 127,44 ($\text{C}_{ipso,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,57 ($\text{C}_{ipso,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,12 ($\text{C}_{ortho,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,25 ($\text{C}_{ortho,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 139,49 (C-8); 149,40 (C-4); 153,20 (C-2); 155,47 (C-6); 160,89 ($\text{C}_{para,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 161,01 ($\text{C}_{para,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

ESI-MS: 386,1 ($[\text{M-H}]^-$); 388,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Elementaranalyse: ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_4 \cdot 0,75 \text{ EtOH}$): N: 15,93 % (theoret.: 16,60 %); C: 53,30 % (55,51 %); H: 5,154 % (5,38 %); C / N: 3,346 (3,344)

6.4.9.2 Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (53, KL50)



100 mg (0,19 mmol) *N*⁶-Cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**50**) wurden nach Vorschrift G umgesetzt. Die Substanz wurde säulenchromatographisch (Petrol-ether : Ethylacetat 30 : 70) gereinigt.

Ausbeute: 54 mg (63 %) eines 1,6 : 1-Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren

Aussehen: beiger Feststoff

DC: $R_f = 0,48$ (7 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Dichlormethan

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,52 – 1,58 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,64 – 1,68 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,72 – 1,78 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 2,09 – 2,14 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 3,80 (s, 2H, O-CH_{3,exo}); 3,82 (s, 1,2H, O-CH_{3,endo}); 4,52 – 4,74 (m, insg. 4H, H-4', 2 x H-5' und *N*⁶-CH); 5,18 (dd, 0,4H, ³*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 6,5 Hz, H-3'_{endo}); 5,27 (dd, 0,6H, ³*J* = 3,6 Hz, ³*J* = 6,2 Hz, H-3'_{exo}); 5,48 (d, 0,6H, ³*J* = 5,5 Hz, H-2'_{exo}); 5,55 (dd, 0,4H, ³*J* = 5,3 Hz, H-2'_{endo}); 5,82 (s, 1H, NH); 5,98 (s, 0,4H, O-CH-O_{endo}); 6,14 (s, 0,6H, O-CH-O_{exo}); 6,23 (d, 0,6H, ³*J* = 2,0 Hz, H-1'_{exo}); 6,29 (d, 0,4H, ³*J* = 1,4 Hz, H-1'_{endo}); 6,90 (dd, 1,3H, ⁴*J* = 2,1 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 6,93 (dd, 0,8H, ⁴*J* = 2,1 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,40 (dd, 1,3H, ⁴*J* = 2,0 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,47 (dd, 0,8H, ⁴*J* = 2,0 Hz, ³*J* = 6,7 Hz, H_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,85 (s, 1H, H-2); 8,35 (s, 1H, H-8)

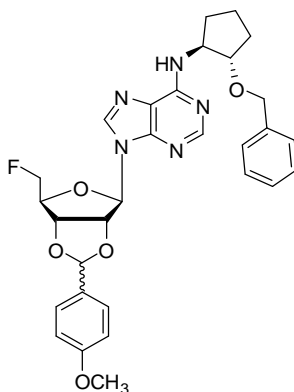
¹³C-NMR (CDCl₃): δ 23,68 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 33,39 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 52,37 (s, *N*⁶-CH); 55,32 (s, O-CH_{3,exo}); 55,36 (s, O-CH_{3,endo}); 80,61 (d, ³*J*_{FC} = 7,0 Hz, C-3'_{exo}); 81,62 (d, ³*J*_{FC} = 6,7 Hz, C-3'_{endo}); 82,77 (d, ¹*J*_{FC} = 172,0 Hz, C-5'_{endo}); 82,88 (d, ¹*J*_{FC} = 172,5 Hz, C-5'_{exo}); 83,87 (s, C-2'_{exo}); 84,04 (d, ²*J*_{FC} = 19,7 Hz, C-4'_{exo}); 85,00 (s, C-2'_{endo}); 85,61 (d, ²*J*_{FC} = 19,9 Hz, C-4'_{endo}); 90,28 (s, C-1'_{exo}); 90,61 (s, C-1'_{endo}); 104,47 (s, O-CH-O_{exo}); 107,83 (s, O-CH-O_{endo});

113,90 (s, $C_{meta,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 113,97 (s, $C_{meta,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 120,16 (s, C-5); 127,46 (s, $C_{ipso,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,59 (s, $C_{ipso,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,13 (s, $C_{ortho,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,26 (s, $C_{ortho,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 138,63 (s, C-8); 153,44 (s, C-2); 154,51 (s, C-6); 160,87 (s, $C_{para,exo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 161,00 (s, $C_{para,endo}$ des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

ESI-MS: 456,1 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 84,9 %

6.4.9.1 Darstellung von N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (89, KL124)



221 mg (0,35 mmol) N^6 -((1*S*,2*S*)-2-Benzoyloxy)cyclopentyl-5'-mesyl-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**88**) wurden nach modifizierter Vorschrift G ausschließlich mit 438 mg (1,39 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat und ohne Zugabe von Tetrabutylammoniumdifluorid-Lösung (50 % in Acetonitril) umgesetzt. Die Substanz wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 20 : 80) von den Reagenzien getrennt und direkt für die nächste Reaktion verwendet.

Ausbeute: 100,2 mg (52 %) eines 1 : 1,2-Gemisches aus *exo*- und *endo*-Diastereomeren

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,85$ (20 % Petrolether in Ethylacetat)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Hexan, Heptan, Wasser, Petrolether

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,54–1,61 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,73–1,80 (br, insg. 2H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,84–1,90 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 1,93–2,00 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 2,28–2,34 (br, 1H, $\text{CH}_2(\text{Cyclopentyl})$); 3,81 (s, 1,6H, $\text{O-CH}_{3,exo}$); 3,82 (s, 1,8H, $\text{O-CH}_{3,endo}$); 3,91–3,95 (br, 1H, Cyclopentyl-CH-O); 4,53–4,71 (m, insg. 6H, 2 x H-5',

CH₂-Ph, N⁶-CH und H-2'); 5,19 (dd, 0,55H, ³J = 2,7 Hz, ³J = 6,6 Hz, H-3'_{endo}); 5,28 (dd, 0,45H, ³J = 3,6 Hz, ³J = 6,3 Hz, H-3'_{exo}); 5,49 (dd, 0,46H, ³J = 2,0 Hz, ³J = 6,2 Hz, H-4'_{exo}); 5,56 (d, 0,56H, ³J = 6,4 Hz, H-4'_{endo}); 5,99 (s, 0,55H, O-CH-O_{endo}); 6,15 (s, 0,45H, O-CH-O_{exo}); 6,24 (d, 0,45H, ³J = 2,2 Hz, H-1'_{exo}); 6,30 (d, 0,55H, ³J = 1,8 Hz, H-1'_{endo}); 6,91 (dd, 0,95H, ⁴J = 2,0 Hz, ³J = 6,7 Hz, H_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 6,94 (dd, 1,15H, ⁴J = 2,0 Hz, ³J = 6,7 Hz, H_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,22 – 7,33 (m, insg. 5H, 5 x H_{arom}); 7,41 (dd, 0,95H, ⁴J = 2,0 Hz, ³J = 6,8 Hz, H_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,48 (dd, 1,15H, ⁴J = 2,0 Hz, ³J = 6,7 Hz, H_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 7,86 (s, 1H, H-2); 8,38 (s, 1H, H-8)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21,55 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 30,39 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 30,92 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 55,31 (s, O-CH_{3,exo}); 55,35 (s, O-CH_{3,endo}); 71,17 (s, CH₂-Ph); 80,60 (d, ³J_{FC} = 7,3 Hz, C-3'_{exo}); 81,61 (d, ³J_{FC} = 6,8 Hz, C-3'_{endo}); 82,74 (d, ¹J_{FC} = 172,2 Hz, C-5'_{endo}); 82,86 (d, ¹J_{FC} = 172,7 Hz, C-5'_{exo}); 83,86 (s, N⁶-CH); 84,01 (d, ²J_{FC} = 19,6 Hz, C-4'_{exo}); 84,81 (s, Cyclopentyl-CH-O); 84,90 (d, ²J_{FC} = 21,0 Hz, C-4'_{endo}); 85,51 (s, C-2'_{endo}); 85,66 (s, C-2'_{exo}); 90,28 (s, C-1'_{exo}); 90,58 (s, C-1'_{endo}); 104,47 (O-CH-O_{exo}); 107,83 (O-CH-O_{endo}); 113,90 (C_{meta,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 113,96 (C_{meta,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,39 (s, C_{arom}); 127,46 (s, C_{ipso} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 127,60 (s, C_{arom}); 128,12 (s, C_{arom}); 128,13 (C_{ortho,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 128,26 (C_{ortho,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 137,56 (s, C-8); 138,66 (s, CH₂-CH_{arom}); 150,82 (s, C-4); 153,28 (s, C-2); 154,37 (s, C-6); 160,87 (C_{para,exo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings); 160,98 (C_{para,endo} des *p*-Methoxybenzyliden-Rings)

ESI-MS: 560,3 ([M-H]⁻); 562,5 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 90,5 %

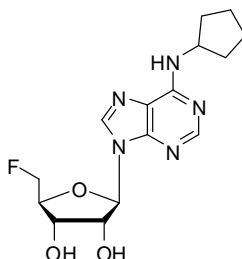
6.4.10 ABSPALTUNG DER 2',3'-*p*-METHOXYBENZYLIDEN- (ANISYLIDEN-)

SCHUTZGRUPPE

Vorschrift H:

Ein Äquivalent des 2',3'-*O-p*-Methoxybenzyliden-geschützten Adenosin-Derivates wurden in 3 ml Dichlormethan und einem Tropfen Wasser suspendiert. Nach Zugabe von 90 – 150 µl (3 – 5 %) Trifluoressigsäure wurde die Lösung klar. Die Reaktion wurde, die unten angegebene Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 10 ml Wasser wurde die freigewordene Schutzgruppe mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die zweite organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter verminderem Druck eingengt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch.²⁰⁰

6.4.10.1 Darstellung von *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluoradenosin (55, KL70)



35,1 mg (0,08 mmol) *N*⁶-Cyclopentyl-5'-desoxy-5'-fluor-2',3'-*O*-*p*-methoxybenzylidenadenosin (**53**) wurden nach Vorschrift H mit 90 µl (3 %) Trifluoressigsäure entschützt. Die Reaktion wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 90 : 10). Das Produkt wurde anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 24 mg (93 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,38$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 114 – 116 °C

Leicht löslich in: Methanol, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Hexan, Toluol, Petrolether

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,53 – 1,63 (br, insg. 4H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,67 – 1,74 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,90 – 1,98 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 4,09 (dd, 0,5H, H-5'); 4,13 (dd, 0,5H, H-5'); 4,25 (pseudo-t, 1H, ³*J* = 5,1 Hz, H-4'); 4,58 (d, 1H, ³*J* = 5,2 Hz, H-2'); 4,59 (d, 1H, ³*J* = 3,0 Hz, H-5'); 4,67 – 4,69 (m, 1H, H-3'); 5,25 – 5,68 (br, insg. 2H, 2'-OH und 3'-OH); 5,94 (d, 1H, ³*J* = 4,8 Hz, H-1'); 7,70 – 7,85 (br, 1H, NH); 8,22 (s, 1H, H-2); 8,26 (s, 1H, H-8)

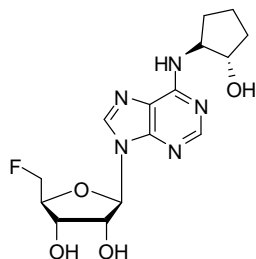
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 23,62 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 32,26 (s, CH₂(Cyclopentyl)); 51,45 (s, *N*⁶-CH); 69,52 (d, ³*J*_{FC} = 5,9 Hz, C-3'); 73,29 (s, C-2'); 82,46 (d, ²*J*_{FC} = 18,9 Hz, C-4'); 83,05 (d, ¹*J*_{FC} = 167,4 Hz, C-5'); 87,88 (s, C-1'); 128,63 (s, C-5); 139,23 (s, C-8); 148,81 (s, C-4); 152,37 (s, C-2); 154,18 (s, C-6)

ESI-MS: 336,0 ([M-H]⁻); 338,4 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 95,5 %

Elementaranalyse: (C₁₅H₂₀FN₅O₃ • EtOH): N: 16,31 % (theoret.: 18,27 %); C: 50,35 % (53,25 %); H: 6,356 % (6,83 %); C / N: 3,087 (2,915)

6.4.10.2 Darstellung von 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyladenosin (92, KL136)



140 mg (0,30 mmol) 5'-Desoxy-5'-fluor-*N*⁶-((1*S*,2*S*)-2-hydroxy)cyclopentyl-3'-*O*-(*p*-methoxybenzyl)adenosin (**90**) wurden nach Vorschrift H mit 150 μ l (5 %) Trifluoressigsäure entschützt. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 80 : 20).

Ausbeute: 65 mg (63%)

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,25$ (20 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 180-181°C

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Hexan, Heptan

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,67 – 1,75 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 1,84 – 1,93 (br, insg. 2H, CH₂(Cyclopentyl)); 2,04 – 2,11 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 2,28 – 2,35 (br, 1H, CH₂(Cyclopentyl)); 4,16 (dd, 1H, ³*J* = 5,1 Hz, ³*J* = 6,6 Hz, *N*⁶-CH); 4,23 – 4,66 (m, 0,5H, H-5'); 4,29 – 4,31 (m, 0,5H, H-5'); 4,44 (pseudo-t, 1H, ³*J* = 5,2 Hz, H-4'); 4,62 – 4,64 (m, 1H, H-5'); 4,65 – 4,83 (m, insg. 2H, H-2' und H-3'); 6,11 (d, 1H, ³*J* = 4,4 Hz, H-1'); 8,23 (s, 1H, H-2); 8,31 (s, 1H, H-8)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 22,33 (CH₂(Cyclopentyl)); 31,47 (CH₂(Cyclopentyl)); 33,57 (CH₂(Cyclopentyl)); 61,64 (*N*⁶-CH); 71,28 (C-3'); 76,09 (C-2'); 79,49 (Cyclopentyl-CH-OH); 83,90 (C-5'); 84,79 (C-4'); 90,40 (C-1'); 121,00 (C-5); 140,32 (C-8); 149,99 (C-4); 154,21 (C-2); 156,44 (C-6)

ESI-MS: 352,1 ([M-H]⁻); 354,3 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 98,8 %

Elementaranalyse: (C₁₅H₂₀FN₅O₄): N: 18,64 % (theoret.: 19,82 %); C: 50,18 % (50,99 %); H: 5,887 % (5,71 %); C/N: 2,692 (2,573)

6.5 PROJEKT 2A: SYNTHESE VON INDOL-DERIVATEN ALS LIGANDEN FÜR DEN GPR17

6.5.1 SYNTHESE DER INDOL-VORSTUFEN

Vorschrift I:

Ein Äquivalent des Anilins wurde in drei Äquivalenten konzentrierter Salzsäure suspendiert oder gelöst und mit Wasser (2 ml pro mmol des Anilins) verdünnt. Nach dem Kühlen der Lösung auf 0 °C, wurde eine 2,5 M Lösung aus einem Äquivalent Natriumnitrit in Wasser tropfenweise so langsam hinzugegeben, dass die Temperatur unter 5 °C verblieb. Nach kompletter Zugabe wurden 5,5 Äquivalente Natriumacetat als 4,5 M Lösung ebenfalls tropfenweise hinzugegeben, gefolgt von einem Äquivalent des entsprechenden Ketons. Die Mischung wurde 15 min bei 0 °C gerührt und über eine Stunde auf Raumtemperatur erwärmt. Das Zwischenprodukt wurde mit Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phase wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Es resultierte ein dunkles Öl, welches in siedende 0,7 M Lösung aus 1,1 Äquivalenten Natriumcarbonat in Wasser gegeben wurde. Die Lösung wurde 5 min gerührt. Nachdem die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde vorsichtig mit 6 N Salzsäure angesäuert. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde mit Chloroform extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.²⁵²

Vorschrift J:

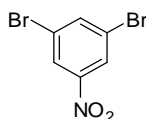
Zu einer Suspension aus einem Äquivalent des Anilins in Wasser (1 ml pro mmol des Anilins) wurde konzentrierte Salzsäure (0,7 ml pro mmol Anilin) gegeben. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt. Eine 3,2 M Lösung aus 1,1 Äquivalenten Natriumnitrit in Wasser wurde dann tropfenweise hinzugegeben und die Mischung wurde 20 min gerührt (Lösung 1). In einem separaten Kolben wurde eine 8,7 M Lösung aus neun Äquivalenten Kaliumhydroxid in Wasser bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung aus einem Äquivalent des entsprechenden Ketons in Ethanol (1 ml pro mmol) gegeben (Lösung 2). Lösung 1 wurde bei 0 °C mit Eis versetzt und Lösung 2 wurde auf einen Schlag hinzugegeben. Die resultierende Mischung wurde für 15 min auf 40 °C erwärmt, auf Raumtemperatur abgekühlt, dreimal mit Diethylether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch wie unten angegeben.²⁵⁴

Vorschrift K:

Zu einer Lösung aus drei Äquivalenten konzentrierter Salzsäure in Wasser (1 ml pro mmol des Anilins) bei -5 °C wurde eine Lösung aus einem Äquivalent des entsprechenden Anilins in

Tetrahydrofuran (0,1 ml pro mmol Anilin) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde eine 4,65 M Lösung aus einem Äquivalent Natriumnitrit in Wasser langsam hinzugegeben. Die Temperatur wurde dabei unter $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Mischung wurde anschließend gerührt, bis der Großteil des Niederschlages in Lösung gegangen war. In der Zwischenzeit wurde eine 2,4 M Lösung aus Kaliumhydroxid in Wasser auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Ein Äquivalent des entsprechenden Ketons wurde mit der Hälfte der Kaliumhydroxid-Lösung extrahiert. Das nicht verbrauchte Cyclopentanon wurde mit 15 ml Toluol rückextrahiert. Die wässrige Phase wurde gesammelt und die organische Toluol-Phase wurde nochmals mit der verbliebenen Kaliumhydroxid-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend auf Eis (160 g pro mmol Anilin) gegeben. Durch Zugabe des Diazoniumsalzes bildete sich ein Niederschlag, der mit Dichlormethan extrahiert wurde. Die Dichlormethan-Phase wurde einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Einengen der Lösung im Vakuum wurde der Rückstand mit Diethylether und Hexan versetzt. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.²⁵³

6.5.1.1 Darstellung von 3,5-Dibromnitrobenzen (168, KL26)²⁷⁸



Eine Mischung aus 5,00 g (16,9 mmol) 2,6-Dibrom-4-nitroanilin (**167**) in 25 ml Ethanol und 2,8 ml konzentrierter Schwefelsäure wurde unter Rückfluss erhitzt. Es wurden portionsweise und so schnell, wie die Schaumbildung es erlaubte, 2,52 g (36,5 mmol) Natriumnitrit hinzugegeben. Die Reaktion wurde für eine weitere halbe Stunde bei dieser Temperatur gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Durch Zugabe von Wasser bildete sich im Filtrat erneut ein Niederschlag, der ebenfalls abfiltriert wurde. Die vereinigten Niederschläge wurden in heißem Ethanol suspendiert, sofort filtriert und im Vakuum getrocknet.²⁷⁸

Ausbeute: 2,84 g (60 %)

Aussehen: hellbrauner Feststoff

DC: $R_f = 0,88$ (2 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$)²⁷⁹

Leicht löslich in: Dichlormethan, DMSO, Chloroform

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Ethylacetat

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8,36 (pseudo-t, 1H, $^4J = 1,6\text{ Hz}$, H-4); 8,39 (d, 2H, $^4J = 1,6\text{ Hz}$, H-2 und H-6)

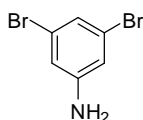
^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 123,12 (C-2 und C-6); 125,69 (C-3 und C-5); 139,98 (C-4); 149,21 (C-1)

ESI-MS: 279,2 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)

Reinheit laut ESI-MS: 92,2 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_6\text{H}_3\text{Br}_2\text{NO}_2 \cdot 0,2 \text{ EtOH}$): N: 4,953 % (theoret.: 4,83 %); C: 27,34 % (26,50 %); H: 1,498 % (1,46 %); C / N: 5,520 (5,487)

6.5.1.2 Darstellung von 3,5-Dibromanilin (169, KL27)²⁸⁰



Zu einer Lösung aus 80 ml konzentrierter Salzsäure und 5,00 g (17,8 mmol) 1,3-Dibrom-5-nitrobenzen (168), wurden 6,34 g (53,4 mmol) Zinnpulver so schnell hinzugegeben, wie die Schaumbildung es erlaubte. Die Reaktion wurde 7 h bei 90 °C gerührt. Nachdem 30 ml Wasser hinzugefügt wurden, wurde durch Zugabe von verdünnter Natronlauge ein pH-Wert von 9 eingestellt. Die Lösung wurde mit Diethylether extrahiert und die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde säulenchromatographisch (100 % Dichlormethan) aufgereinigt.²⁸⁰

Ausbeute: 3,40 g (76 %)

Aussehen: hellgelber Feststoff

DC: $R_f = 0,86$ (100 % Dichlormethan)

Smp.: 54 °C (Lit.: 54-55 °C)²⁸¹

Leicht löslich in: Ethylacetat, Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Methanol

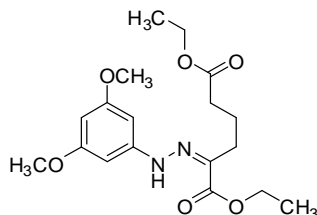
Schwer löslich in: Wasser

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 5,76 (s, 2H; NH_2); 6,71 (d, 2H, $^4J = 1,6 \text{ Hz}$, H-2 und H-6); 6,76 (t, 1H, $^4J = 1,6 \text{ Hz}$; H-4)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 115,06 (C-2 und C-6); 119,46 (C-3 und C-5); 122,72 (C-4); 151,93 (C-1)

Elementaranalyse: ($\text{C}_6\text{H}_3\text{Br}_2\text{N}$): N: 5,588 % (theoret.: 5,58 %); C: 28,87 % (28,72 %); H: 1,915 % (2,01 %); C / N: 5,166 (5,147)

6.5.1.3 Darstellung von Diethyl-2-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)hydrazono)hexandioat (**163**, KL18_o)



Methode A:

2,70 g (15,0 mmol) 3,5-Dimethoxyanilin (**161**) wurden nach Vorschrift I mit 2,2 ml (15,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) umgesetzt. Nach Zugabe von Natriumnitrit färbte sich die Suspension bräunlich. Der erhaltene Niederschlag wurde ohne Aufreinigung weiterverwendet.

Aussehen: brauner Feststoff

DC: $R_f = 0,51$ (25 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 119 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Dichlormethan, DMSO, Chloroform

Schwer löslich in: Wasser, Hexan

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,29 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,35 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,73 (dt, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, $^3J = 8,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,42 (t, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,58 (t, 2H, $^3J = 8,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,79 (s, insg. 6H, 2 x O-CH₃); 4,23 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,27 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,08 (pseudo-t; 1H, $^4J = 2,2$ Hz, H-4); 6,55 (d, 2H, $^4J = 2,2$ Hz, H-2 und H-6); 9,66 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,17 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,31 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 19,40 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 24,22 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 32,20 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 55,26 (2 x O-CH₃); 61,00 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,10 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 92,58 (C-2 und C-6); 94,02 (C-4); 134,56 (C-N); 145,82 (C=N); 161,55 (2 x C-O-CH₃); 165,27 (C=O); 175,27 (C=O)

Methode B:

4,76 g (30,9 mmol) 3,5-Dimethoxyanilin (**161**) wurden nach Vorschrift J mit 7,20 g (46,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) umgesetzt. Die Substanz wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 30 : 70) gereinigt und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,12 g (10 %)

Aussehen: hellbeiger Feststoff

DC: $R_f = 0,51$ (25 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 119 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Dichlormethan, DMSO, Chloroform

Schwer löslich in: Wasser, Hexan

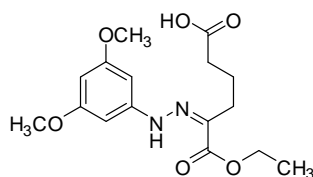
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,29 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,35 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,73 (dt, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, $^3J = 8,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,42 (t, 2H, $^3J = 5,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,58 (t, 2H, $^3J = 8,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,79 (s, insg. 6H, 2 x O-CH₃); 4,22 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,27 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,08 (pseudo-t; 1H, $^4J = 2,2$ Hz, H-4); 6,54 (d, 2H, $^4J = 2,3$ Hz, H-2 und H-6); 9,66 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,17 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,31 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 19,40 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 24,22 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 32,20 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 55,26 (2 x O-CH₃); 61,00 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,10 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 92,58 (C-2 und C-6); 94,02 (C-4); 134,56 (C-N); 145,82 (C=N); 161,55 (2 x C-O-CH₃); 165,27 (C=O); 175,27 (C=O)

ESI-MS: 365,0 ($[\text{M-H}]^-$); 367,4 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 97,9 %

6.5.1.4 Darstellung von 5-(2-(3,5-Dimethoxyphenyl)hydrazono)-6-ethoxy-6-oxohexansäure (**162**, **KL18b_o**)



4,53 g (29,8 mmol) 3,5-Dimethoxyanilin (**161**) wurden nach Vorschrift K mit 3,7 ml (28,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) umgesetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde ohne Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 2,94 g (29 %)

Aussehen: orange-brauner Feststoff

DC: $R_f = 0,21$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 143 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, DMSO, Chloroform

Schwer löslich in: Wasser, Hexan

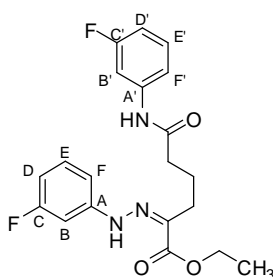
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1,26 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,62 (pseudo-t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,25 (t, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,56 (t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,71 (s, insg. 6H, 2 x O-CH₃); 4,18 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,05 (pseudo-t; 1H, $^3J = 2,2$ Hz, H-4); 6,47 (d, 2H, $^3J = 2,2$ Hz, H-2 und H-6); 10,32 (s, 1H, NH)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 14,32 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 20,84 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 24,34 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 33,67 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 55,14 (2 x O- CH_3); 60,29 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 92,48 (C-2 und C-6); 93,25 (C-4); 134,97 (C-N); 146,35 (C=N); 161,25 (2 x C-O- CH_3); 164,80 (C=O); 175,09 (CO_2H)

ESI-MS: 337,4 ($[\text{M-H}]^-$); 339,5 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 96,0 %

6.5.1.5 Darstellung von Ethyl-2-(2-(3-fluorphenyl)hydrazono)-6-(4-fluorphenylamino)-6-oxohexanoat (157, KL30_o)



Ethyl-2-(2-(3-fluorphenyl)hydrazono)-6-(4-fluorphenylamino)-6-oxohexanoat wurde nach modifizierter Vorschrift K hergestellt. Dazu wurden 2,78 g (25,0 mmol) 3-Fluoranilin in 10 ml Toluol suspendiert, zu der verdünnten und gekühlten Säure gegeben und mit 1,70 g (25,0 mmol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser umgesetzt. 3,7 ml (28,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) wurden in der Zwischenzeit mit der Kaliumhydroxid-Lösung extrahiert. Die weitere Umsetzung und Aufarbeitung erfolgte wie in Vorschrift K angegeben.

Ausbeute: 2,73 g (28 %)

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,42$ (45 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 166 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Ethylacetat, DMSO, Dichlormethan, Petrolether

Schwer löslich in: Wasser

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 1,25 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,76 (t, 2H, $^3J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,39 (t, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,63 (t, 2H, $^3J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 4,18 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,68 (tdd, 1H, $^5J = 0,7$ Hz, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 8,3$ Hz, H_{arom}); 6,85 (tdd, 1H, $^5J = 1,1$ Hz, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 8,3$ Hz, H_{arom}); 7,01 (dt, 1H, $^4J = 2,3$ Hz, $^3J = 11,5$ Hz, H_{arom}); 7,07 (ddd, 1H, $^5J = 0,8$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J = 8,2$ Hz, H_{arom}); 7,27–7,32 (m, insg. 3H, 3 x H_{arom}); 7,59 (dt, 1H, $^4J = 2,1$ Hz, $^3J = 11,8$ Hz, H_{arom}); 10,16 (s, 1H, NH); 10,27 (s, 1H, NH)

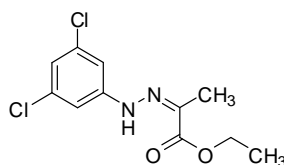
^{13}C -NMR (DMSO- d_6) (zur Nummerierung der aromatischen C-Atome, siehe Strukturformel): δ 15,06 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 21,68 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 25,07 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 36,23 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 61,22 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 101,30; 106,97; 108,08 und 110,49 (je d, $^2J_{\text{FC}} = 21,2$ Hz bzw. $^2J_{\text{FC}} = 26,3$ Hz, C-B, C-D, C-B' und C-D'); 110,56 (s, C-F); 115,76 (s, C-F'); 131,17 und 131,73 (je d, $^3J_{\text{FC}} = 9,6$ Hz, C-E und C-E'); 137,04 (s, C=N); 141,78 (d, $^3J_{\text{FC}} = 11,0$ Hz, C-A'); 147,26 (d, $^3J_{\text{FC}} = 11,0$ Hz, C-A); 163,95 und 164,86 (je d, $^1J_{\text{FC}} = 241,3$ Hz, C-C und C-C'); 165,45 (s, C=O), 172,44 (C=O)

ESI-MS: 388,4 ($[\text{M-H}]^-$); 390,0 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 97,5 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 0,25 \text{ H}_2\text{O}$): N: 10,52 % (theoret.: 10,67 %); C: 61,55 % (60,98 %); H: 5,546 % (5,50 %); C / N: 5,851 (5,715)

6.5.1.6 Darstellung von Ethyl-2-(2-(3,5-Dichlorphenyl)hydrazono)propanoat (**198**, KL71_o)



5,00 g (30,9 mmol) 3,5-Dichloranilin (**99**) wurden nach modifizierter Vorschrift J mit 6,5 ml (46,0 mmol) Ethyl-2-methylacetoacetat (**197**) umgesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 90 : 10) gereinigt.

Ausbeute: 6,34 g (75 %) eines (*E,Z*)-Diastereomergemischs

Aussehen: hellbeiger Feststoff

DC: $R_f = 0,75$ und $0,48$ (10 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 127 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, DMSO, Chloroform, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Hexan

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 1,26 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,05 (s, 3H, CH_3); 4,20 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,01 (pseudo-t, 1H, $^4J = 1,9$ Hz, H-4); 7,21 (d, 2H, $^4J = 1,9$ Hz, H-2 und H-6); 10,06 (s, 1H, NH)

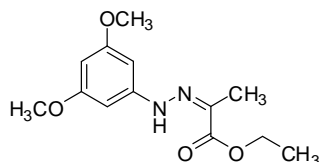
^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 12,26 (CH_3); 14,33 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,00 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 112,10 (C-2 und C-6); 119,67 (C-4); 134,72 (C-3 und C-5); 135,25 (C-N); 146,92 (C=N); 164,59 (C=O)

ESI-MS: 273,0 ($[\text{M-H}]^-$); 275,4 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,6 %

Elementaranalyse: ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_2$): N: 9,66 % (theoret.: 10,18 %); C: 48,34 % (48,02 %); H: 4,242 % (4,40 %); C / N: 5,004 (4,717)

6.5.1.7 Darstellung von Ethyl-2-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)hydrazono)propanoat (**248**, KL105_o)



4,77 g (30,9 mmol) 3,5-Dimethoxyanilin (**161**) wurden nach modifizierter Vorschrift J mit 6,5 ml (46 mmol) Ethyl-2-methyl-acetoacetat (**197**) umgesetzt. Das Produkt wurde säulen-chromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 75 : 25) gereinigt.

Ausbeute: 3,27 g (39 %) eines (*E,Z*)-Diastereomergemischs

Aussehen: orangefarbener Feststoff

DC: $R_f = 0,39$ (25 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 93,6 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, DMSO, Chloroform, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Petrolether

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 1,35 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, CH_2-CH_3); 2,07 (s, 3H, CH_3); 3,77 (s, insg. 6H, 2 x O- CH_3); 4,28 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH_2-CH_3); 6,08 (pseudo-t; 1H, $^4J = 2,2$ Hz, H-4); 6,39 (d, 2H, $^4J = 2,2$ Hz, H-2 und H-6); 7,63 (s, 1H, NH)

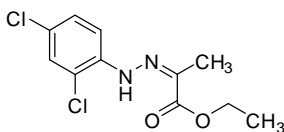
^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ 10,26 (CH_3); 14,28 (CH_2-CH_3); 55,34 (O- CH_3); 61,22 (CH_2-CH_3); 92,69 (C-2 und C-6); 94,37 (C-4); 132,64 (C-N); 145,17 (C=N); 161,64 (2 x O- CH_3); 165,16 (C=O)

ESI-MS: 265,3 ($[M-H]^-$); 267,1 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 85,6 %

Elementaranalyse: ($C_{13}H_{18}N_2O_4$): N: 9,928 % (theoret.: 10,52 %); C: 58,70 % (58,63 %); H: 6,722 % (6,81 %); C / N: 5,913 (5,573)

6.5.1.8 Darstellung von Ethyl-2-(2-(2,4-dichlorphenyl)hydrazono)propanoat (**220**, KL123_o)



5,00 g (30,9 mmol) 2,4-Dichloranilin (**219**) wurden nach modifizierter Vorschrift J mit 6,5 ml (46 mmol) Ethyl-2-methyl-acetoacetat (**197**) umgesetzt. Die Substanz wurde säulenchromato-

graphisch zunächst mit Petrolether : Ethylacetat 85 : 15 anschließend noch einmal mit Petrolether : Ethylacetat 90 : 10 gereinigt und in dieser Reinheit für die nächste Reaktion verwendet.

Ausbeute: 5,08 g (60 %) eines (*E,Z*)-Diastereomerengemischs

Aussehen: orange-roter Feststoff

DC: $R_f = 0,56$ (10 % Ethylacetat in Petrolether)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Diethylether, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser

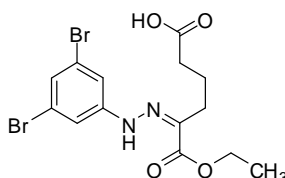
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,36 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,13 (s, 3H, CH_3); 4,31 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,21 (dd, 1H, $^4J = 2,3$ Hz, $^3J = 8,8$ Hz, H-5); 7,30 (d, 1H, $^4J = 2,3$ Hz, H-3); 7,59 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, H-6); 8,00 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 10,57 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,29 (CH_3); 61,49 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 116,15 (C-6); 118,73 (C-4); 126,33 (C-2); 128,27 und 128,72 (C-3 und C-5); 135,86 (C-1); 138,07 (C=N); 164,75 (C=O)

ESI-MS: 273,0 ($[\text{M-H}]^-$); 275,0 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 76,7 %

6.5.1.9 Darstellung von 5-(2-(3,5-Dibromphenyl)hydrazono-6-ethoxy-6-oxohexansäure (170, KL73_o)



3,87 g (15,4 mmol) 3,5-Dibromanilin (**169**) wurden nach modifizierter Vorschrift J mit 3,4 ml (23,0 mmol) Ethyl-2-oxocyclopentylcarboxylat (**155**) umgesetzt. Nachdem die resultierende, orangefarbene Mischung für 15 min auf 40 °C erwärmt, auf Raumtemperatur abgekühlt und dreimal mit Diethylether extrahiert worden war, wurde sie über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend wurde der Rückstand mit 5 ml Diethylether versetzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Dieser wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 60 : 40) gereinigt. Der Überstand wurde ebenfalls säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 75 : 25) gereinigt.

Ausbeute: 2,19 g (33 %); außerdem wurden 730 mg Ethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)-6-(3,5-dibromphenylamino)-6-oxohexanoat (**172**) und 354 mg Diethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)hexandioat (**171**) erhalten

Aussehen: farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0,39$ (40 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 128 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,34 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,95 (pseudo-t, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,44 (t, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,56 (t, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 4,18 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,16 – 7,17 (br, 1H, H-4); 7,20 – 7,22 (br, 2H, H-2 und H-6); 12,04 (s, 1H, CO_2H); (1 Signal (NH) nicht detektierbar)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 14,09 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 22,34 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 32,02 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 33,04 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 61,16 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 115,28 (C-2 und C-6); 123,50 (2 x C-Br); 126,67 (C-4); 130,25 (C-N); 145,65 (C=N); 163,40 (C=O); 178,66 (CO_2H)

ESI-MS: 435,3 ($[\text{M-H}]^-$); 437,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 96,3 %

6.5.2 RINGSCHLUSS-METHODEN

Vorschrift L:

Ein Äquivalent des jeweiligen Hydrazons wurde mit zwei Äquivalenten *p*-Toluensulfonsäure in 10 ml getrocknetem Toluol 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf 0 °C gekühlt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert und die wässrige Phase gesammelt. Diese wurde einmal mit Ethylacetat gewaschen und wieder auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure vorsichtig auf pH 1 angesäuert, wobei ein Niederschlag entstand, der abfiltriert wurde. Der Niederschlag wurde wie unten angegeben aufgereinigt.²⁵³

Vorschrift M:

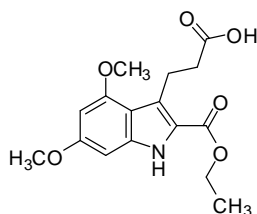
Ein Äquivalent des jeweiligen Hydrazons wurde mit 5 g Polyphosphorsäure in 10 ml Toluol 20 min bei 45 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Eis hydrolysiert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und wie unten angegeben aufgereinigt.²⁵⁵

Vorschrift N:

Ein Äquivalent des jeweiligen Hydrazons wurde mit 5 ml konzentrierter Schwefelsäure in 50 ml Ethanol unter Argon-Atmosphäre über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde abgekühlt und mit Wasser verdünnt. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde mit Wasser ge-

waschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch wie unten angegeben.²⁵²

6.5.2.1 Darstellung von 3-(2-(Ethoxycarbonyl)-4,6-dimethoxy-1*H*-indol-3-yl)propan-säure (164, KL18)



300 mg (0,89 mmol) 5-(2-(3,5-Dimethoxyphenyl)hydrazono)-6-ethoxy-6-oxohexansäure (**162**) wurden nach modifizierter Vorschrift L mit 2,53 g (1,33 mmol) *p*-Toluensulfonsäure in 10 ml getrocknetem Toluol umgesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 2 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 18 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 20 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer 40 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.

Ausbeute: 92 mg (32 %) als 1 : 3 – Triethylamin-Salz

Aussehen: beiges Pulver

DC: $R_f = 0,14$ (45 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 69 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Ethylacetat, DMSO, Dichlormethan

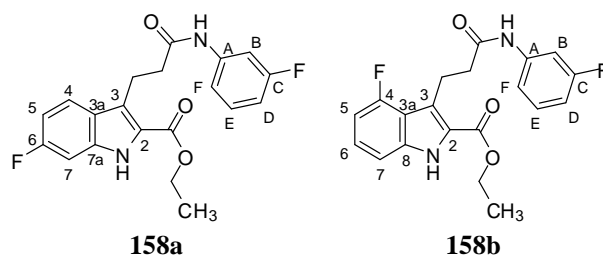
Schwer löslich in: Wasser

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 0,94 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 1,32 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 2,41 (t, 2H, $^3J = 8,3$ Hz, CH₂-CH₂); 2,42 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 3,35 (t, 2H, $^3J = 8,3$ Hz, CH₂-CH₂); 3,74 (s, 3H, O-CH₃); 3,81 (s, 3H, O-CH₃); 4,27 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 6,12 (d; 1H, $^3J = 1,9$ Hz, H-7); 6,42 (d, 2H, $^3J = 1,9$ Hz, H-5); 11,25 (s, 1H, NH)

ESI-MS: 320,1 ([M-H]⁻); 322,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 96,9 %

6.5.2.2 Darstellung des Isomerengemischs aus Ethyl-6-fluor-3-(3-(3-fluorphenylamino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat und Ethyl-4-fluor-3-(3-(3-fluorphenylamino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (KL30_1 und KL30_2)



300 mg (0,77 mmol) Ethyl-2-(2-(3-fluorphenyl)hydrazono)-6-(4-fluorphenylamino)-6-oxohexanoat (**157**) wurden nach modifizierter Vorschrift L mit 2,53 g (1,33 mmol) *p*-Toluensulfonsäure in 10 ml getrocknetem Toluol umgesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 60 : 40) aufgereinigt.

Ausbeute: 27 mg (9 %) eines Isomerengemisches

Aussehen: beiges Pulver

DC: $R_f = 0,77$ (45 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 219 °C

Leicht löslich in: Ethylacetat, DMSO, Dichlormethan, Petrolether

Schwer löslich in: Wasser

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1,45 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,74 (t, 2H, $^3J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,52 (t, 2H, $^3J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4,43 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,82 (tdd, 1H, $^5J = 0,8$ Hz, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 8,4$ Hz, H_{arom}); 6,88 (td, 1H, $^4J = 2,3$ Hz, $^3J = 9,3$ Hz, H_{arom}); 7,11 (dd, 1H, $^4J = 2,3$ Hz, $^3J = 9,8$ Hz, H_{arom}); 7,17 (ddd, 1H, $^5J = 0,8$ Hz, $^4J = 1,4$ Hz, $^3J = 8,2$ Hz, H_{arom}); 7,25–7,30 (m, 1H, H_{arom}); 7,74 (dd, 1H, $^4J = 1,2$ Hz, $^3J = 8,3$ Hz, H_{arom}); (2 Signale (NH und CONH) nicht detektierbar)

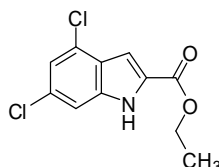
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) (zur Nummerierung der aromatischen C-Atome, siehe Strukturformel): δ 15,04 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 22,22 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 39,50 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 62,02 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 98,82 (d, $^2J_{\text{FC}} = 25,9$ Hz, C-5 von Struktur **158a**); 108,46 (d, $^2J_{\text{FC}} = 26,4$ Hz, C-7 von Struktur **158a**); 108,49 (s, C-7 von Struktur **158b**); 108,88 (d, $^3J_{\text{FC}} = 12,2$ Hz, C-4 von Struktur **158a**); 110,36 (d, $^2J_{\text{FC}} = 25,5$ Hz, C-D); 111,49 (d, $^2J_{\text{FC}} = 22,0$ Hz, C-5 von Struktur **158b**); 111,59 (d, $^2J_{\text{FC}} = 21,5$ Hz, C-B); 116,79 (d, $^4J_{\text{FC}} = 2,6$ Hz, C-3); 119,99 (d, $^2J_{\text{FC}} = 19,5$ Hz, C-3a von Struktur **158b**); 121,91 (s, C-F); 123,32 (d, $^3J_{\text{FC}} = 10,5$ Hz, C-6 von Struktur **158b**); 124,30 (s, C-3a von Struktur **158a**); 125,81 (s, C-2); 129,98 (d, $^3J_{\text{FC}} = 5,5$ Hz, C-E); 131,07 (d, $^3J_{\text{FC}} = 8,8$ Hz, C-A); 131,31 (d, $^3J_{\text{FC}} = 9,3$ Hz, C-7a); 163,56 (d, $^1J_{\text{FC}} = 240,0$ Hz, C-4 von Struktur **158b**);

163,65 (C=O); 163,84 (d, $^1J_{\text{FC}} = 251,0$ Hz, C-C); 164,53 (d, $^1J_{\text{FC}} = 242,2$ Hz, C-6 von Struktur **158a**); 174,33 (C=O)

ESI-MS: 371,4 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); 373,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 98,2 %

6.5.2.3 Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**, KL71)²⁵⁵



750 mg (2,73 mmol) Ethyl-2-(2-(3,5-dichlorphenyl)hydrazono)propanoat (**198**) wurden nach Vorschrift M umgesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 90 : 10) aufgereinigt.²⁵⁵

Ausbeute: 685 mg (97 %)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,69$ (100 % Dichlormethan)

Smp.: 185 °C (Lit: 185 – 187 °C)²⁸²

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Petrolether

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,34 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,35 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,10 (d, 1H, $^4J = 0,9$ Hz, H-7); 7,26 (d, 1H, $^4J = 1,7$ Hz, H-3); 7,44 (dd, 1H, $^4J = 0,9$ Hz, $^4J = 1,7$ Hz, H-5); 12,38 (s, 1H, NH)

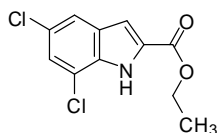
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 14,31 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,08 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 105,45 (C-3); 111,50 (C-7); 120,16 (C-5); 124,50 (C-2); 127,00 (C-3a); 129,20 (C-6); 129,36 (C-4); 137,72 (C-7a); 160,68 (C=O)

ESI-MS: 256,0 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)

Reinheit laut ESI-MS: 100 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_2 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$): N: 5,019 % (theoret.: 5,24 %); C: 47,72 % (49,46 %); H: 3,733 % (3,77 %); C / N: 9,508 (9,439)

6.5.2.4 Darstellung von Ethyl-5,7-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**221**, KL123)²⁸³



507 mg (1,84 mmol) Ethyl-2-(2-(2,4-dichlorphenyl)hydrazonopropanoat (**220**) wurden nach Vorschrift N cyclisiert. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 90 : 10).²⁵²

Ausbeute: 135 mg (28 %)

Aussehen: gelber Feststoff

DC: $R_f = 0,58$ (10 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 143 °C (Lit: 143 – 145 °C)²⁸³

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 1,34 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 4,35 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 7,22 (s, 1H, H-3); 7,43 (d, 1H, $^4J = 1,9$ Hz, H-6); 7,74 (d, 1H, $^4J = 1,9$ Hz, H-4); 12,34 (s, 1H, NH)

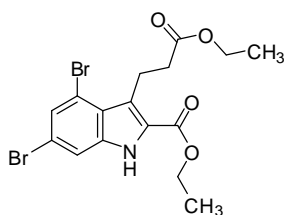
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 14,30 (CH₂-CH₃); 60,96 (CH₂-CH₃); 108,85 (C-3); 117,96 (C-7); 120,45 (C-6); 124,04 (C-4); 124,70 (C-2); 129,08 (C-5); 130,59 (C-3a); 133,31 (C-7a); 160,63 (C=O)

ESI-MS: 255,9 ([M-H]⁻)

Reinheit laut ESI-MS: 95,9 %

Elementaranalyse: (C₁₁H₉Cl₂NO₂ • 0,5 EtOAc): N: 4,861 % (theoret.: 4,64 %); C: 52,26 % (51,68 %); H: 4,592 % (4,34 %); C / N: 10,751 (11,138)

6.5.2.5 Darstellung von Ethyl-4,6-dibrom-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**173**, KL73)



258 mg (0,56 mmol) Diethyl-2-(2-(3,5-dibromphenyl)hydrazono)hexandioat (**171**) wurden nach modifizierter Vorschrift N mit 5 g Polyphosphorsäure und 10 ml Toluol bei 50 °C über Nacht gerührt. Da keine vollständige Umsetzung des Eduktes erzielt werden konnte, wurden am nächsten Tag nochmals 5 g Polyphosphorsäure zugegeben. Die Mischung wurde anschließend bei 70 °C über Nacht gerührt. Der durch die Hydrolyse mit Eis entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 75 : 25) aufgereinigt.

Ausbeute: 128 mg (51 %)

Aussehen: hellbeiger Feststoff

DC: $R_f = 0,51$ (15 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 260 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,24 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,41 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,65 (t, 2H, $^3J = 8,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,67 (t, 2H, $^3J = 8,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4,14 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,41 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,43 (d, 1H, $^4J = 1,5$ Hz, H-7); 7,46 (d, 1H, $^4J = 1,6$ Hz, H-5); 8,92 (s, 1H, NH)

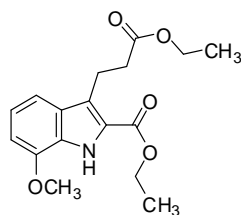
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,22 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,25 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 20,22 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 36,23 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 60,32 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,42 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 114,01 (C-7); 116,50 (C-4); 118,61 (C-6); 123,44 (C-3); 124,42 (C-2); 125,20 (C-3a); 127,90 (C-5); 137,20 (C-7a); 161,57 (C=O); 172,78 (C=O)

ESI-MS: 446,0 ($[\text{M-H}]^-$); 448,0 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 94,6 %

6.5.3 INDOLSYNTHESE OHNE ISOLATION DER VORSTUFE

6.5.3.1 Darstellung von Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-7-methoxy-1H-indol-2-carboxylat (**249**, KL13)



1,7 ml (15,0 mmol) 2-Methoxyanilin wurden nach Vorschrift I bei 0 °C mit 1,04 g (15,0 mmol) Natriumnitrit als 2,5 M Lösung und 6,79 g (82,5 mmol) Natriumacetat als 4,5 M Lösung versetzt. Daraufhin färbte sich die Lösung gelb. Nach Zugabe von 2,2 ml (15,0 mmol) Ethyl-2-oxocyclopentancarboxylat (**155**) bildete sich ein dunkelbrauner Niederschlag. Dieser wurde, wie in Vorschrift I angegeben, behandelt. Die Cyclisierung des Hydrazon-Zwischenproduktes wurde nach Vorschrift N mit 5 ml Schwefelsäure in 50 ml Ethanol durchgeführt. Der Rückstand, der dabei erhalten wurde, wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 90 : 10) aufgereinigt. Die vereinigten Produktfraktionen wurden im Vakuum eingengt und aus Hexan : Ethylacetat (85 : 15) umkristallisiert.

Ausbeute: 75 mg (2 %)

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,35$ (10 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 83 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Methanol, Wasser, Ethanol, Petrolether

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,19 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,41 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,65 (t, 2H, $^3J = 7,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,37 (t, 2H, $^3J = 7,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,94 (s, 3H, O-CH₃); 4,09 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,40 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,70 (d, 1H, $^3J = 7,5$ Hz, H_{arom}), 7,04 (pseudo-t, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, H-5); 7,28 (d, 1H, $^3J = 8,2$ Hz, H_{arom}); 8,87 (s, 1H, NH)

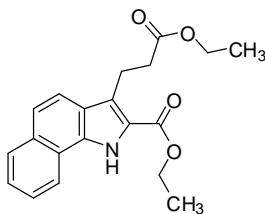
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,17 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,36 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 20,59 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 35,32 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 55,40 (O-CH₃); 60,31 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 60,79 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 104,38 (C-6); 113,01 (C-4); 120,63 (C-3); 123,13 (C-5); 123,15 (C-2); 126,95 (C-7a); 128,88 (C-3a); 146,40 (C-7); 161,91 (C=O); 173,18 (C=O)

ESI-MS: 318,2 ($[\text{M-H}]^-$); 320,2 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 95,6 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5 \cdot 0,25 \text{ EtOAc}$): N: 4,18 % (theoret.: 4,10 %); C: 64,14 % (63,33 %); H: 7,18 % (6,79 %); C/N: 15,354 (15,446)

6.5.3.2 Darstellung von Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1H-benzo[g]indol-2-carboxylat (143, KL14)²⁸⁴



2,15 g (15,0 mmol) 1-Naphthylamin (**141**) wurden nach Vorschrift I bei 0 °C mit 1,04 g (15,0 mmol) Natriumnitrit als 2,5 M Lösung und 6,79 g (82,5 mmol) Natriumacetat als 4,5 M Lösung versetzt. Daraufhin färbte sich die Lösung braun. Nach Zugabe von 2,2 ml (15,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) bildete sich ein schwarz-brauner, klebriger Niederschlag in der nun gelb-orangefarbenen Lösung. Dieser wurde, wie in Vorschrift I angegeben, behandelt. Die Cyclisierung des Hydrazon-Zwischenproduktes wurde nach Vorschrift N mit 5 g Schwefelsäure in 50 ml Ethanol durchgeführt. Der Rückstand, der dabei erhalten wurde, wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrol-

ether : Ethylacetat 90 : 10) aufgereinigt. Die vereinigten Produktfraktionen wurden im Vakuum eingengt und aus Hexan : Ethylacetat (85 : 15) umkristallisiert.²⁵²

Ausbeute: 188 mg (4 %)

Aussehen: rötliche Kristalle

DC: $R_f = 0,22$ (10 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 139 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Pentan, Methanol, Petrolether

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,19 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂-CH₃); 1,45 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂-CH₃); 2,70 (t, 2H, $^3J = 7,8$ Hz, CH₂-CH₂); 3,45 (t, 2H, $^3J = 7,8$ Hz, CH₂-CH₂); 4,09 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂-CH₃); 4,45 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂-CH₃); 7,47 – 7,56 (m, insg. 3H, 3 x H_{arom}); 7,71 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, H_{arom}); 7,89 (d, 1H, $^3J = 7,4$ Hz, H_{arom}); 8,10 (d, 1H, $^3J = 8,2$ Hz, H_{arom}); 9,58 (s, 1H, NH)

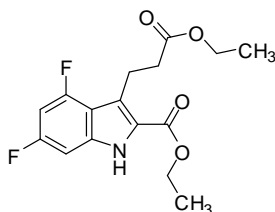
¹³C-NMR (CDCl₃): δ 14,34 (CH₂-CH₃); 14,59 (CH₂-CH₃); 20,71 (CH₂-CH₂); 35,72 (CH₂-CH₂); 60,53 (CH₂-CH₃); 61,06 (CH₂-CH₃); 119,43 – 132,20 (12 Signale, 12 x C_{arom}); 162,14 (C=O); 173,16 (C=O)

ESI-MS: 338,3 ([M-H]⁻); 340,3 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 98,0 %

Elementaranalyse: (C₂₀H₂₁NO₄): N: 4,31 % (theoret.: 4,13 %); C: 69,96 % (70,78 %); H: 6,17 % (6,24 %); C/N: 16,23 (17,14)

6.5.3.3 Darstellung von Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4,6-difluor-1H-indol-2-carboxylat (**147**, KL17)



2,35 g (15,0 mmol) 3,5-Difluoranilin (**145**) wurden nach Vorschrift I bei 0 °C mit 1,04 g (15,0 mmol) Natriumnitrit als 2,5 M Lösung und 6,79 g (82,5 mmol) Natriumacetat als 4,5 M Lösung versetzt. Daraufhin färbte sich die Lösung rot. Nach Zugabe von 2,2 ml (15,0 mmol) Ethyl-2-oxocyclopentancarboxylat (**155**) bildete sich ein orange-roter Niederschlag in der nun gelben Lösung. Dieser wurde, wie in Vorschrift I angegeben, behandelt. Die Cyclisierung des Hydrazon-Zwischenproduktes wurde nach modifizierter Vorschrift L mit 870 mg *p*-Toluensulfonsäure in 50 ml getrocknetem Toluol durchgeführt. Das Rohprodukt wurde in

wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrol-ether : Ethylacetat 90 : 10) aufgereinigt. Die vereinigten Produktfraktionen wurden unter vermindertem Druck eingedunstet und aus Hexan : Ethylacetat (85 : 15) umkristallisiert.

Ausbeute: 651 mg (13 %)

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,76$ (25 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 125 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Petrolether

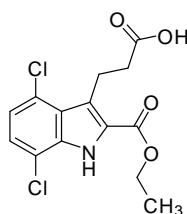
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,21 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,40 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,65 (t, 2H, $^3J = 8,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,47 (t, 2H, $^3J = 8,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4,11 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,40 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 6,58 (ddd, 1H, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J_{\text{FH}} = 9,9$ Hz, $^3J_{\text{FH}} = 11,1$ Hz, H-5), 6,81 (dd, 1H, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J_{\text{FH}} = 8,8$ Hz, H-7); 8,94 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,16 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,29 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 21,28 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 35,63 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 60,34 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,19 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 93,91 (dd, $^4J_{\text{FC}} = 4,7$ Hz, $^2J_{\text{FC}} = 26,1$ Hz, C-7); 96,46 (dd, $^2J_{\text{FC}} = 23,8$ Hz, $^2J_{\text{FC}} = 29,2$ Hz, C-5); 113,79 (d, $^2J_{\text{FC}} = 18,8$ Hz, 4J -Kopplung nicht sichtbar, C-3a); 121,69 (s, C-3); 124,06 (s, C-2); 137,06 (dd, $^3J_{\text{FC}} = 12,8$ Hz, $^3J_{\text{FC}} = 14,8$ Hz, C-7a); 157,89 (dd, $^3J_{\text{FC}} = 15,0$ Hz, $^1J_{\text{FC}} = 253,0$ Hz, C-4); 161,34 (dd, $^3J_{\text{FC}} = 12,2$ Hz, $^1J_{\text{FC}} = 243,8$ Hz, C-6); 161,60 (s; C=O); 172,81 (s; C=O)

ESI-MS: 324,1 ($[\text{M-H}]^-$); 326,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Elementaranalyse: ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{NO}_4$): N: 4,317 % (theoret.: 4,31 %); C: 59,07 % (59,07 %); H: 5,159 % (5,27 %); C / N: 13,683 (13,705)

6.5.3.4 Darstellung von 3-(4,7-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1H-indol-3-yl)propansäure (138, KL19)



2,43 g (15,0 mmol) 2,5-Dichloranilin (**132**) wurden nach Vorschrift I bei 0 °C mit 1,04 g (15,0 mmol) Natriumnitrit als 2,5 M Lösung und 6,79 g (82,5 mmol) Natriumacetat als 4,5 M Lösung versetzt. Daraufhin färbte sich die Lösung gelb. Nach Zugabe von 2,2 ml (15,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) wurde, wie in Vorschrift I angegeben weiter gearbeitet. Das Hydrazon-Zwischenprodukt (**136**) wurde nach modifizierter Vorschrift L mit 902 mg

p-Toluensulfonsäure und 50 ml getrocknetem Toluol in 2 h cyclisiert. Das Rohprodukt wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrol-ether : Ethylacetat 90 : 10) aufgetrennt. Da keine ausreichende Reinheit erzielt werden konnte, wurde das Produkt anschließend über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 2,5 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 22,5 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 20 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer 40 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.

Ausbeute: 76 mg (1,5 %)

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,51$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: > 250 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Pentan, Petrolether

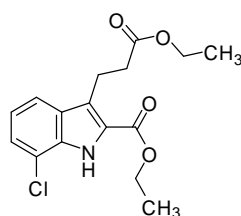
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1,48 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,58 (t, 2H, $^3J = 8,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,67 (t, 2H, $^3J = 8,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4,48 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,07 (d, 1H, $^3J = 8,2$ Hz, H-5), 7,26 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, H-6); (2 Signale (NH und CO_2H) nicht detektierbar)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 14,98 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 23,25 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 41,19 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 62,47 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 117,68 (C-7); 122,80 (C-3); 125,86 (C-6); 126,60 (C-5); 126,66 (C-2); 127,38 (C-4); 128,04 (C-3a); 136,42 (C-7); 163,43 (C=O); 181,89 (CO_2H)

ESI-MS: 328,0 ($[\text{M-H}]^-$); 330,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 97,9 %

6.5.3.5 Darstellung von Ethyl-7-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**137**, **KL12**)²⁸⁵



1,6 ml (15,0 mmol) 2-Chloranilin (**131**) wurden nach Vorschrift I bei 0 °C mit 1,04 g (15,0 mmol) Natriumnitrit als 2,5 M Lösung und 6,79 g (82,5 mmol) Natriumacetat als 4,5 M Lösung versetzt.²⁵² Daraufhin färbte sich die Lösung gelb-orange. Nach Zugabe von 2,2 ml (15,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) wurde, wie in Vorschrift I angegeben weiter gearbeitet.²⁵² Die Cyclisierung des Hydrazon-Zwischenproduktes (**135**) wurde nach

Vorschrift N mit 5 g Schwefelsäure in 50 ml Ethanol durchgeführt.²⁵² Das Rohprodukt wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 85 : 15) aufgereinigt.

Ausbeute: 507 mg (10 %)

Aussehen: hellbeiger Feststoff

DC: $R_f = 0,26$ (15 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 95 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Methanol, Ethanol, Wasser, Petrolether

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,09 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂-CH₃); 1,35 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 2,58 (t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, CH₂-CH₂); 3,29 (t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, CH₂-CH₂); 3,98 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 4,35 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 7,08 (dd, 1H, $^4J = 0,8$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz, H-6); 7,34 (dd, 1H, $^4J = 0,8$ Hz, $^3J = 7,6$ Hz, H-4), 7,67 (d, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, H-5); 11,64 (s, 1H, NH)

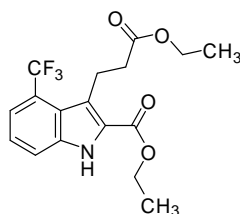
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 14,12 (CH₂-CH₃); 14,23 (CH₂-CH₃); 20,20 (CH₂-CH₂); 34,94 (CH₂-CH₂); 59,91 (CH₂-CH₃); 60,66 (CH₂-CH₃); 116,82 (C-7); 119,55 (C-4); 120,69 (C-6); 122,75 (C-3); 124,67 (C-5); 125,17 (C-2); 129,00 (C-3a); 133,38 (C-7a); 161,28 (C=O); 172,29 (C=O)

ESI-MS: 322,0 ([M-H]⁻); 324,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 100 %

Elementaranalyse: (C₁₆H₁₈ClNO₄): N: 4,340 % (theoret.: 4,33 %); C: 59,05 % (59,35 %); H: 5,601 % (5,60 %); C / N: 13,606 (13,707)

6.5.3.6 Darstellung von Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**151**, KL29)



3,1 ml (25,0 mmol) 3-(Trifluormethyl)anilin (**149**) wurden nach Vorschrift I bei 0 °C mit 1,73 g (25,0 mmol) Natriumnitrit als 2,5 M Lösung und 11,3 g (138 mmol) Natriumacetat als 4,5 M Lösung versetzt. Nach Zugabe von 3,7 ml (25,0 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclopentancarboxylat (**155**) wurde, wie in Vorschrift I angegeben, weiter gearbeitet. Die Cyclisierung des Hydrazon-Zwischenproduktes (**150**) wurde nach Vorschrift N mit Schwefelsäure in Ethanol durchgeführt.

Das Rohprodukt wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 75 : 25) aufgereinigt.

Ausbeute: 357 mg (4%)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,48$ (25 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 94 – 96 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Methanol, Wasser, Ethanol

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,26 t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$; 1,42 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,59 (t, 2H, $^3J = 8,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,50 (t, 2H, $^3J = 8,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4,16 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,44 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,32 (pseudo-t, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, H-6), 7,50 (d, 1H, $^3J = 7,4$ Hz, H-5); 7,58 (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz, H-7); 9,92 (s, 1H, NH)

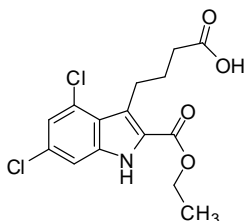
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,23 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 20,53 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 20,56 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 35,34 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 60,24 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,43 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 116,28 (s, C-7); 119,36 (q, $^3J_{\text{FC}} = 6,6$ Hz, C-5); 121,88 (s, C-3); 122,36 – 122,42 (br, C-3a); 123,15 (q, $^2J_{\text{FC}} = 32,1$ Hz, C-4); 123,96 (s, C-6); 124,37 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271,6$ Hz, CF_3); 125,67 (s, C-2); 136,68 (s, C-7a); 161,74 (s, C=O); 173,05 (s, C=O)

ESI-MS (Startlaufmittel: 65 % H_2O mit 2mM NH_4OAc : 35 % Acetonitril mit 0,03 % Trifluoressigsäure; Endlaufmittel: 100 % Acetonitril mit 0,03 % Trifluoressigsäure; Gradientendauer: 20 min.): 358,4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 98,8 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_4$): N: 3,96 % (theoret.: 3,92 %); C: 57,36 % (57,14 %); H: 4,799 % (5,08 %); C / N: 14,485 (14,577)

6.5.3.7 Darstellung von 3-(4,6-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1H-indol-3-yl)butansäure (**195**, KL67)²⁵³



5,00 g (30,9 mmol) 3,5-Dichloranilin (**99**) wurden nach modifizierter Vorschrift J mit 7,85 g (46 mmol) Ethyl-2-oxo-cyclohexancarboxylat (**155**) umgesetzt. Die erhaltene 5-(2-(3,5-Dichlorphenyl)-hydrazono)-6-ethoxy-6-oxohexansäure (**150**) wurde in 150 ml Essigsäure gelöst und mit

15 ml Polyphosphorsäure versetzt. Die Lösung wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt, und anschließend unter vermindertem Druck eingengt. Es wurden 100 ml Wasser zugefügt und die Mischung wurde dreimal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde die Lösung filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 40 : 60) aufgereinigt.²⁵⁴

Ausbeute: 99 mg (1 %)

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,63$ (40 % Petrolether in Ethylacetat)

Smp.: 216 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Pentan, Hexan, Petrolether

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,35 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 1,84 (pseudo-q, 2H, $^3J = 7,6$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂); 2,24 (t, 2H, $^3J = 7,6$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂); 3,27 (t, 2H, $^3J = 7,6$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂); 4,35 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, CH₂-CH₃); 7,15 (d; 1H, $^4J = 1,8$ Hz, H-7); 7,41 (d; 1H, $^4J = 1,8$ Hz, H-5); 11,99 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 14,29 (CH₂-CH₃); 23,80 (CH₂-CH₂-CH₂); 27,30 (CH₂-CH₂-CH₂); 33,57 (CH₂-CH₂-CH₂); 60,82 (CH₂-CH₃); 111,39 (C-7); 120,81 (C-3); 122,21 (C-5); 122,65 (C-2); 125,54 (C-3a); 127,63 (C-6); 129,01 (C-4); 137,67 (C-7a); 161,26 (C=O); 174,28 (CO₂H)

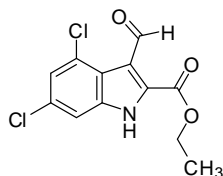
ESI-MS: 342,0 ([M-H]⁻); 344,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 98,6 %

Elementaranalyse: (C₁₅H₁₅Cl₂NO₄): N: 4,188 % (theoret.: 4,07 %); C: 52,13 % (52,34 %); H: 4,532 % (4,39 %); C / N: 12,447 (12,860)

6.5.4 MODIFIKATIONEN AM INDOL-GRUNDGERÜST

6.5.4.1 Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-3-formyl-1*H*-indol-2-carboxylat (210, KL100) durch Vilsmeier-Haack-Formylierung von Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (199)²⁶⁰



Zu einer gerührten Lösung aus 150 mg (0,58 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan und 68 μ l (0,87 mmol) *N,N*-Dimethylformamid bei Raumtemperatur wurden 80 μ l (0,87 mmol) frisch destilliertes Phosphorylchlorid langsam zuge tropft. Die Mischung wurde zweieinhalb Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und sparsam mit kaltem Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde dann mit 1 M Natriumacetat-Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und mit Wasser erneut gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag 16 h im Hochvakuum getrocknet und für die nächste Reaktion verwendet.²⁶⁰

Ausbeute: 157 mg (95 %)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,29$ in 100 % Dichlormethan

Leicht löslich in: -- (sehr schwer löslich)

Schwer löslich in: Ethylacetat, Ethanol, Dichlormethan, Methanol

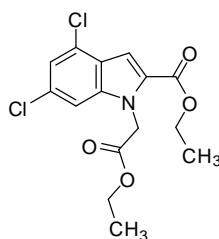
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,37 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,43 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,41 (d, 1H, $^4J = 1,8$ Hz, H-7); 7,57 (d, 1H, $^4J = 1,8$ Hz, H-5); 10,62 (s, 1H, CHO); 13,19 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 14,14 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 62,32 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 111,96 (C-7); 119,10 (C-3); 121,32 (C_{arom}); 124,07 (C-5); 127,54 (C_{arom}); 130,01 (C_{arom}); 134,24 (C-3a); 137,62 (C-7a); 160,00 (C=O); 186,04 (CHO)

ESI-MS: 284,1 ($[\text{M-H}]^-$); 286,0 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 90,6 %

6.5.4.2 Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**204**, KL101)



100 mg (0,38 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) wurden zusammen mit 122 mg (0,88 mmol) Kaliumcarbonat und 116 mg (0,54 mmol) Ethyl-3-iodacetat (**203**) in 10 ml Acetonitril 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Mischung in 25 ml Wasser gegeben und zweimal mit 25 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde dreimal

mit 25 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde anschließend säulenchromatographisch (100 % Dichlormethan) aufgereinigt.²⁵⁷

Ausbeute: 104 mg (79 %)

Aussehen: hellgelbes Pulver

DC: $R_f = 0,65$ in 100 % Dichlormethan

Smp.: 116 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Diethylether; DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,20 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,31 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,14 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,30 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 5,38 (s, 2H, CH_2); 7,27 (d, 1H, $^4J = 0,8$ Hz, H-7); 7,36 (d, 1H, $^4J = 0,8$ Hz, H-5); 7,94 (dd, 1H, $^4J = 0,8$ Hz, $^4J = 1,4$ Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 14,10 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,14 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 46,99 (CH_2); 61,12 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 61,17 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 107,88 (C-7); 110,67 (C-3); 120,90 (C-5); 122,99 – 130,13 (4 Signale, 4 x C_{arom}); 139,78 (C-7a); 160,60 (C=O); 168,58 (C=O)

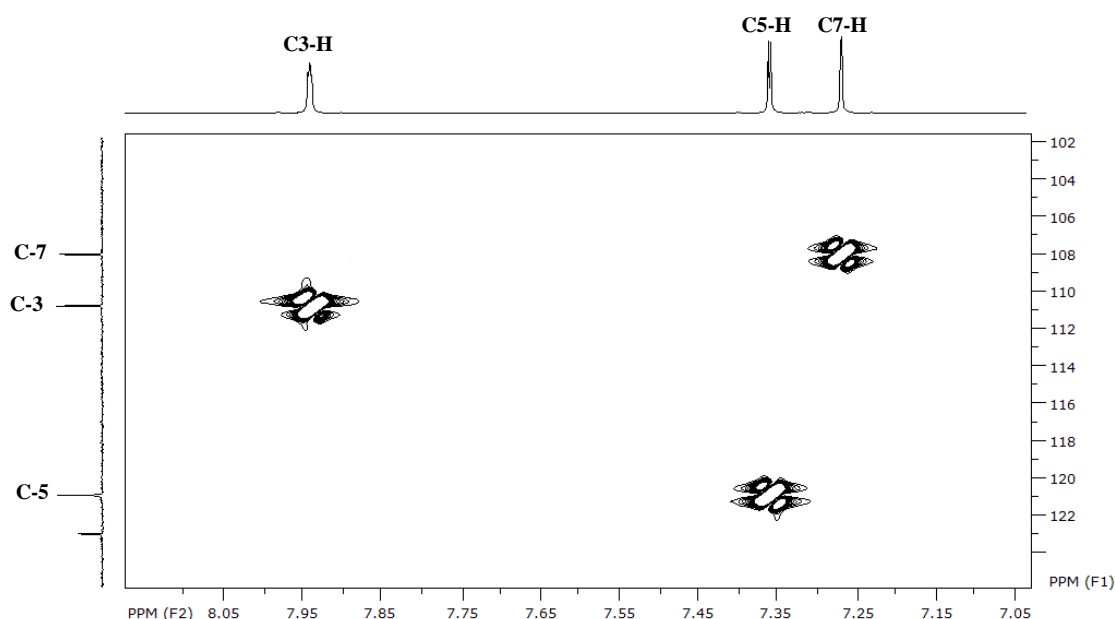


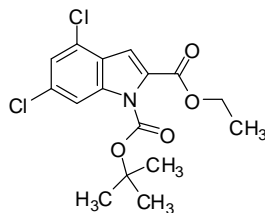
Abbildung 6.4: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum der Verbindung 204.

ESI-MS: 342,4 ($[\text{M-H}]^-$); 344,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 98,8 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NO}_4$): N: 4,122 % (theoret.: 4,07 %); C: 52,12 % (52,34 %); H: 4,552 % (4,39 %); C/N: 12,644 (12,860)

6.5.4.3 Darstellung von 1-*tert*-Butyl-2-ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-1,2-dicarboxylat (**207**, KL115)



110 μ l (0,50 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat (BOC_2O , **206**) wurden tropfenweise zu einer gerührten Mischung aus 101,4 mg (0,39 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) und 12 mg (0,08 mmol) Cäsiumfluorid in 1 ml DMF gegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in Wasser gegeben. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde in wenigen Millilitern Dichlormethan gelöst und säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 90 : 10) aufgereinigt.²⁵⁹

Ausbeute: 104 mg (74 %)

Aussehen: farblose Kristalle

DC: $R_f = 0,32$ (5 % Ethylacetat in Petrolether)

Smp.: 79 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,39 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,60 (s, insg. 9H, 3 x CH_3); 4,37 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 7,13 (d, 1H, $^5J = 0,7$ Hz, H-7), 7,26 (d, 1H, $^5J = 1,6$ Hz, H-5); 8,02 (dd, 1H, $^5J = 0,7$ Hz, $^5J = 1,6$ Hz, H-3)

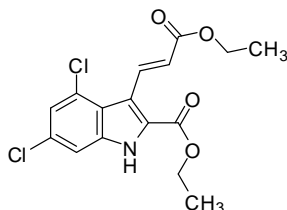
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,22 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 27,73 (3 x CH_3); 61,73 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 85,73 ($\text{C-(CH}_3)_3$); 112,00 (C-3); 113,87 (C-7); 123,59 (C-5); 125,16 (C-2); 127,73 (C-3a); 131,67 (C-6); 132,69 (C-4); 138,11 (C-7a); 148,52 (N-C=O); 161,12 (C=O)

ESI-MS: 358,3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,1 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{NO}_4$): N: 3,941 % (theoret.: 3,91 %), C: 53,64 % (53,65 %), H: 4,682 % (4,78 %), C/N: 13,611 (13,721)

6.5.4.4 Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zur Darstellung von Ethyl-4,6-dichlor-3-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-enyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**209**, KL103)



Eine Mischung aus 100 mg (0,39 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-3-formyl-1*H*-indol-2-carboxylat (**210**), 173 mg (0,50 mmol) Ethyl-(triphenylphosphoranylidene)acetat (**211**) und 6,6 ml Toluol wurden über Nacht, unter Schutzgas, unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt mehrmals säulenchromatographisch (Petrolether : Ethylacetat 85 : 15) aufgearbeitet. Da keine größere Reinheit durch Säulenchromatographie oder Umkristallisation erzielt werden konnte, wurde das Produkt in dieser Reinheit ohne weitere Analytik weiterverwendet.²⁵³

Ausbeute: 67 mg (54 %)

Aussehen: hellgelber Feststoff

DC: $R_f = 0,29$ (15 % Ethylacetat in Petrolether)

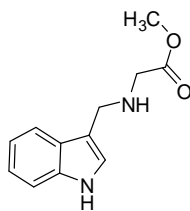
Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

ESI-MS: 354,3 ($[M-H]^-$); 356,3 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 86,9 %

6.5.4.5 Darstellung von Methyl-2-((1*H*-indol-3-yl)methylamino)acetat (**216**, KL116)²⁸⁶



Eine Lösung aus 56,3 mg (0,39 mmol) Indol-3-carbaldehyd (**214**), 168 mg (1,34 mmol) Glycinmethylester-Hydrochlorid (**215**) und 24,4 mg (0,39 mmol) Natriumcyanborhydrid in 5 ml Methanol wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand in 10 ml 2 M Salzsäure gelöst. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert, mit Natriumchlorid gesättigt und mit Dichlormethan extrahiert. Die zweite organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedunstet.²⁸⁷

Ausbeute: 63 mg (63 % als Hydrochlorid)

Aussehen: hellgelber Feststoff

DC: $R_f = 0,43$ (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 82 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Petrolether

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2,17 – 2,31 (br, 2H, NH als Hydrochlorid); 3,48 (s, 2H, CH_2); 3,70 (s, 3H, O- CH_3); 4,01 (s, 2H, CH_2); 7,12 (td, 1H, $^4J = 1,0$ Hz, $^3J = 7,1$ Hz, $^3J = 7,8$ Hz, H-5); 7,14 (d, 1H, $^4J = 2,1$ Hz, H-2); 7,18 (td, 1H, $^4J = 1,0$ Hz, $^3J = 7,1$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz, H-6); 7,35 (d, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, H-7); 7,68 (d, 1H, $^3J = 7,8$ Hz, H-4); 8,18 (s, 1H, NH)

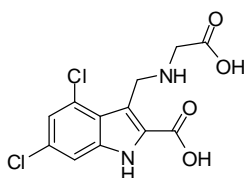
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 44,08 (CH_2); 49,73 (CH_2); 51,77 (O- CH_3); 111,18 (C-7); 113,72 (C-3); 118,87 (C-4); 119,67 (C-5); 122,20 (C-6); 123,05 (C-2); 127,03 (C-3a); 136,34 (C-7a); 172,80 (C=O)

ESI-MS: 217,4 ($[\text{M-H}]^-$); 219,4 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 88,0 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$): N: 11,87 % (theoret.: 11,00 %), C: 63,38 % (56,58 %), H: 6,372 % (5,94 %), C / N: 5,340 (5,144)

6.5.4.6 Darstellung von 3-((Carboxymethylamino)methyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**218**, KL128)



Eine Lösung aus 788 mg (2,75 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-3-formyl-1*H*-indol-2-carboxylat (**210**), 958 mg (7,63 mmol) Glycinmethylester-Hydrochlorid (**215**) und 192 mg (0,42 mmol) Natriumcyanborhydrid in 20 ml Methanol wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand in 20 ml 2 M Salzsäure gelöst. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert, mit Natriumchlorid gesättigt und mit Dichlormethan extrahiert. Die zweite organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert, unter vermindertem Druck eingeeengt. Man erhielt 612 mg einer 8 : 1 – Mischung aus Ethyl-4,6-dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**217**) und 2-((4,6-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1*H*-indol-3-yl)methylamino)essigsäure. Von dieser Mischung wurden 220 mg (0,62 mmol) in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit

10 ml Wasser verdünnt und mit 257 mg (6,13 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, mit Wasser verdünnt, mit Salzsäure angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Produkt wurde anschließend über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 3,5 ml Methanol : Triethylamin (99,5 : 0,5) und 6,5 ml Wasser : Triethylamin (99,5 : 0,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 35 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer 55 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.^{252,287}

Ausbeute: 124 mg (20 %) eines Triethylamin-Salzes (über zwei Stufen)

Aussehen: weißer Feststoff

Smp.: 106 °C

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Dichlormethan, Chloroform

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,34 (t, insg. 9H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 3,24 (q, insg. 6H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 3,58 (s, 2H, CH₂-NH); 4,96 (s, 2H, NH-CH₂); 7,16 (d, 1H, ⁴J = 1,8 Hz, H-7); 7,49 (d, 1H, ⁴J = 1,7 Hz, H-5); (4 Signale (2 x NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 9,44 (CH₂-CH₃(Triethylamin)); 42,91 (CH₂-NH); 48,00 (CH₂-CH₃(Triethylamin)); 49,16 (NH-CH₂); 108,36 (C-3); 112,68 (C-7); 123,07 (C-5); 123,97 (C-2); 128,06 (C-3a); 130,33 (C-6); 137,80 (C-4); 137,94 (C-7); 167,75 (CO₂H); 171,28 (CO₂H)

ESI-MS: 315,1 ([M-H]⁻); 317,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 99,1 %

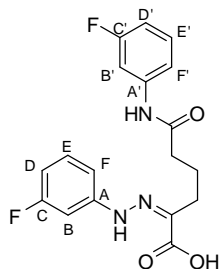
Elementaranalyse: (C₁₈H₂₅Cl₂N₃O₄ • 0,75 MeOH): N: 9,197 % (theoret.: 9,28 %), C: 47,23 % (49,73 %), H: 5,64 % (5,90 %), C / N: 5,135 (5,359)

6.5.5 VERSEIFUNG

Vorschrift O:

Ein Äquivalent des jeweiligen Eduktes wurde in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst oder suspendiert, mit 10 ml Wasser verdünnt und mit zehn Äquivalenten Lithiumhydroxid-Monohydrat versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, anschließend mit Wasser verdünnt, mit 6 N Salzsäure angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte wie unten angegeben.²⁵²

6.5.5.1 Darstellung von 2-(2-(3-Fluorphenyl)hydrazono)-6-(3-fluorphenylamino)-6-oxohexansäure (**160**, KL59)



101,4 mg (0,26 mmol) Ethyl-2-(2-(3-fluorphenyl)hydrazono)-6-(4-fluorphenylamino)-6-oxohexanoat (**157**) wurden nach Vorschrift O verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 84 mg (89 %)

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,26$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 159 °C

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat, DMSO, Dichlormethan

Schwer löslich in: Wasser

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,75 (t, 2H, $^3J = 7,4$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2}$); 2,40 (t, 2H, $^3J = 7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,62 (t, 2H, $^3J = 7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 6,67 (td, 1H, $^4J = 2,2$ Hz, $^3J = 8,4$ Hz, H_{arom}); 6,83 – 6,87 (m, 1H, $^3J = 7,5$ Hz, H_{arom}); 7,12 (dd, 1H, $^4J = 1,2$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz, H_{arom}); 7,22 (dt, 1H, $^4J = 2,2$ Hz, H_{arom}); 7,26 – 7,32 (m, insg. 3H, 3 x H_{arom}); 7,59 (d, 1H, $^3J = 11,8$ Hz, H_{arom}); 10,17 (s, 1H, NH); 10,21 (s, 1H, NH); 12,00 (s, 1H, CO_2H)

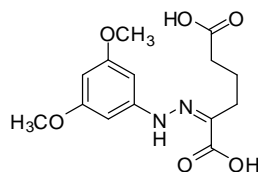
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (zur Nummerierung der aromatischen C-Atome, siehe Strukturformel): δ 20,94 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 23,95 (s, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2}$); 35,56 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 100,72 (d, $^2J_{\text{FC}} = 26,6$ Hz, C-B, C-B', C-D oder C-D'); 106,14 (d, $^2J_{\text{FC}} = 26,2$ Hz, C-B, C-B', C-D oder C-D'); 107,17 (d, $^2J_{\text{FC}} = 21,4$ Hz, C-B, C-B', C-D oder C-D'); 109,67 (d, $^2J_{\text{FC}} = 21,2$ Hz, C-B, C-B', C-D oder C-D'); 109,97 (d, $^4J_{\text{FC}} = 1,6$ Hz, C-F); 115,04 (d, $^4J_{\text{FC}} = 1,7$ Hz, C-F'); 130,40 (d, $^3J_{\text{FC}} = 9,5$ Hz, C-E'); 130,76 (d, $^3J_{\text{FC}} = 9,7$ Hz, C-E); 136,90 (s, C=N); 140,99 (d, $^3J_{\text{FC}} = 11,1$ Hz, C-A'); 146,43 (d, $^3J_{\text{FC}} = 11,2$ Hz, C-A); 162,25 (d, $^1J_{\text{FC}} = 241,0$ Hz, C-C'); 163,27 (d, $^1J_{\text{FC}} = 241,0$ Hz, C-C); 165,96 (CO_2H); 171,75 (C=O)

ESI-MS: 360,5 ($[\text{M-H}]^-$); 362,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,0 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$): N: 10,71 % (theoret.: 11,08 %); C: 55,09 % (56,99 %); H: 5,307 % (5,05 %); C/N: 5,144 (5,144)

6.5.5.2 Darstellung von 2-(2-(3,5-Dimethoxyphenyl)hydrazono)hexandisäure (**165**, KL58)



21,5 mg (0,06 mmol) Diethyl-2-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)hydrazono)hexandioat (**163**) wurden mit 26,7 mg (0,64 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat nach Vorschrift O versetzt und über Nacht gerührt. Es wurden nochmals 26,7 mg (0,64 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat zugefügt und eine weitere Nacht gerührt. Nachdem die Reaktion vollständig war, wurde das Produkt, wie in Vorschrift O beschrieben, aufgearbeitet.

Ausbeute: 19 mg (94 %) eines (*E,Z*)-Diastereomerengemischs

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,90$ (25 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Ethanol, Ethylacetat, Methanol

Schwer löslich in: Petrolether, Pentan, Hexan

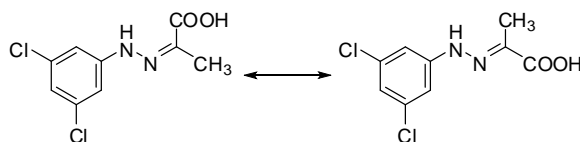
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1,77 (t, 2H, $^3J = 8,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,49 (t, 2H, $^3J = 6,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,67 (t, 2H, $^3J = 8,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,81 (s, insg. 6H, 2 x O-CH₃); 6,11 (dd, 1H, $^4J = 1,7$ Hz, H-4); 6,66 (d, 2H, $^4J = 1,4$ Hz, H-2 und H-6); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 21,41 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 25,10 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 33,68 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 56,07 (2 x O-CH₃); 93,99 (C-2 und C-6); 95,64 (C-4); 136,08 (C=N); 147,32 (C-1); 163,35 (C-3 und C-5); 168,71 (CO₂H); 178,29 (CO₂H)

ESI-MS: 309,4 ($[\text{M-H}]^-$); 311,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 88,2 %

6.5.5.3 Darstellung von 2-(2-(3,5-dichlorphenyl)hydrazono)propansäure (**201**, KL98)



100 mg (0,36 mmol) Ethyl-2-(2-(3,5-dichlorphenyl)hydrazono)propanoat (**198**) wurden nach Vorschrift O verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 90 mg (100 %) eines (*E,Z*)-Diastereomerengemischs

Aussehen: farbloser Feststoff

Smp.: 180 – 182 °C

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Heptan

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2,03 (s, 3H, CH₃); 6,99 (dd, 1H, ⁴*J* = 1,9 Hz, H-4); 7,38 (d, 2H, ⁴*J* = 1,9 Hz, H-2 und H-6); 9,96 – 10,02 (br, 1H, NH); 11,78 – 12,41 (br, 1H, NH)

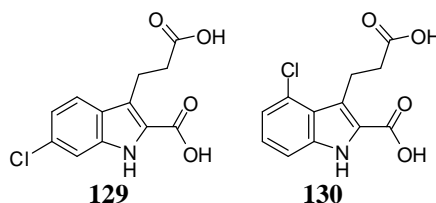
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 11,80 (CH₃); 112,33 (C-2 und C-6); 119,60 (C-4); 134,68 (C=N); 135,79 (C-3 und C-5); 146,86 (C-1); 165,84 (C=O)

ESI-MS: 245,4 ([M-H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 97,7 %

Elementaranalyse: (C₉H₈Cl₂N₂O₂ • 0,25 EtOAc): N: 10,35 % (theoret.: 10,41 %), C: 45,22 % (44,63 %), H: 3,727 % (3,75 %), C / N: 4,369 (4,287)

6.5.5.4 Darstellung des Isomerengemisches aus 3-(2-Carboxyethyl)-6-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure und 3-(2-Carboxyethyl)-4-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (KL16-1 und KL16-2)



300 mg (0,93 mmol) eines Isomerengemischs aus Ethyl-6-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**127**) und Ethyl-4-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**128**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 117 mg (2,79 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde anschließend aus heißem Ethylacetat : Hexan (1 : 1) umkristallisiert.

Ausbeute: 154 mg (62 %) einer 2 : 1-Mischung aus **129** und **130** (siehe Abbildung 6.5)

Aussehen: farbloses Pulver

Smp.: 207 °C

Leicht löslich in: Methanol, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Hexan, Pentan

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2,49 (unter Lösungsmittelpeak, CH₂-CH₂); 3,23 (t, 2H, ³*J* = 8,1 Hz, CH₂-CH₂ von Struktur **129**); 3,52 (t, 1H, ³*J* = 8,4 Hz, CH₂-CH₂ von Struktur **130**); 7,05 (dd, 1H,

$^4J = 1,9$ Hz, $^3J = 8,6$ Hz, H-5 von Struktur **129**); 7,06 (dd, 0,5H, $^4J = 0,8$ Hz, $^3J = 7,5$ Hz, H-5 von Struktur **130**); 7,18 (dd, 1H, 0,5H, $^3J = 7,7$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz, H-6 von Struktur **130**); 7,36 (dd, 0,5H, $^4J = 0,8$ Hz, $^3J = 8,9$ Hz, H-7 von Struktur **130**); 7,38 (d, 1H, $^4J = 1,9$ Hz, H-7 von Struktur **129**); 7,69 (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz, H-4 von Struktur **129**); 11,56 (s, 1H, NH von Struktur **129**); 11,81 (s, 0,5H, NH von Struktur **130**); 12,54 (s, insg. 3H, 2 x CO₂H von Struktur **129** und 2 x 0,5 x CO₂H von Struktur **130**)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 19,90 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2$ von Struktur **130**); 20,36 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2$ von Struktur **129**); 35,14 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$ von Struktur **130**); 36,41 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$ von Struktur **129**); 111,78 (C-7 von Struktur **130**); 111,95 (C-7 von Struktur **129**); 119, 98 (C-3); 120,63 (C-6 von Struktur **130**); 121,54 (C-5); 122,20 (C-4 von Struktur **129**); 123,19 (C-2); 125,05 (C-3a von Struktur **129**); 125,97 (C-3a von Struktur **130**); 126,24 (C-4 von Struktur **130**); 129,28 (C-6 von Struktur **129**); 136,30 (C-7a von Struktur **129**); 137,64 (C-7a von Struktur **130**); 163,02 (CO₂H); 174,00 (CO₂H)

ESI-MS: 266,0 ($[\text{M-H}]^-$); 268,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 94,2 %

Elementaranalyse: (C₁₂H₁₀ClNO₄): N: 5,11 % (theoret.: 5,23 %); C: 53,42 % (53,85 %); H: 4,02 % (3,77 %); C/N: 10,46 (10,29)

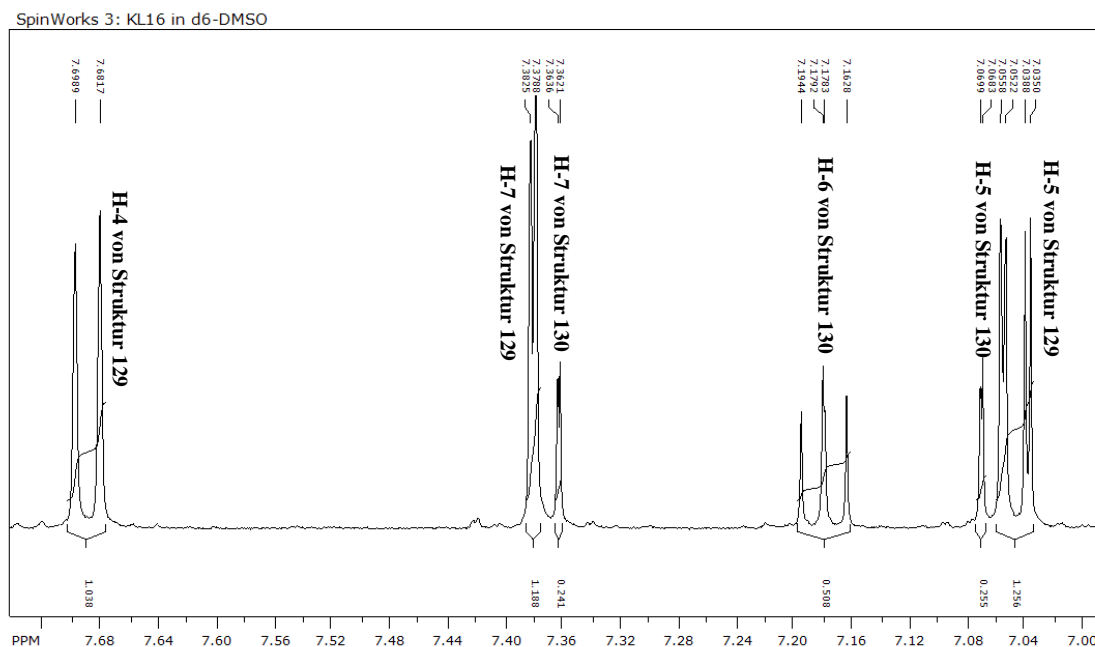
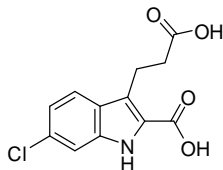


Abbildung 6.5: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum des Isomerengemischs der Verbindungen **129** und **130**.

6.5.5.5 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-6-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**129**, KL16-1)²⁵²



224 mg (0,69 mmol) Ethyl-6-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**127**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 87,0 mg (2,07 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat bei 60 °C über Nacht verseift. Das Produkt wurde anschließend aus heißem Ethylacetat : Hexan (1 : 1) umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.²⁵²

Ausbeute: 98 mg (53 %)

Aussehen: farbloses Pulver

Smp.: 235 °C (Lit: 234-236 °C)²⁵²

Leicht löslich in: Methanol, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Hexan, Pentan

¹H-NMR (CD₃OD): δ 2,52 (zum Teil unter Lösungsmittelpeak, CH₂-CH₂); 3,23 (t, 2H, ³*J* = 7,8 Hz, CH₂-CH₂); 7,04 (dd, 1H, ⁴*J* = 1,9 Hz, ³*J* = 8,6 Hz, H-5); 7,38 (dd, 1H, ⁴*J* = 1,8 Hz, H-7); 7,69 (d, 1H, ³*J* = 8,7 Hz, H-4); 11,56 (s, 1H, NH); 12,55 (s, insg. 2H, 2 x CO₂H)

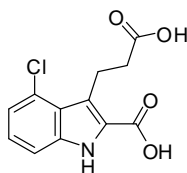
¹³C-NMR (CD₃OD): δ 21,52 (CH₂-CH₂); 36,45 (CH₂-CH₂); 113,03 (C-7); 121,71 (C-5); 122,96 (C-4); 123,73 (C-3a); 126,46 (C-2); 127,69 (C-3); 132,16 (C-6); 138,25 (C-7a); 165,15 (CO₂H); 177,38 (CO₂H)

ESI-MS: 266,1 ([M-H]⁻); 268,0 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 93,6 %

Elementaranalyse: (C₁₂H₁₀ClNO₄ • 0,25 EtOAc): N: 4,783 % (theoret.: 4,84 %); C: 52,95 % (53,90 %); H: 4,105 % (4,18 %); C / N: 11,070 (11,136)

6.5.5.6 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-4-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**130**, KL16-2)²⁵²



55,5 mg (0,17 mmol) Ethyl-4-chlor-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**128**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 72 mg (1,71 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat bei

60 °C über Nacht verseift. Das Produkt wurde anschließend aus heißem Ethylacetat : Hexan (1 : 1) umkristallisiert. Da keine ausreichende Reinheit erzielt werden konnte, wurde das Produkt anschließend über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 2 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 18 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 10 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer 35 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.²⁵²

Ausbeute: 22 mg (47 %)

Aussehen: farbloses Pulver

Smp.: 260 °C (Lit: 255-256°C)²⁵²

Leicht löslich in: Methanol, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Hexan, Pentan

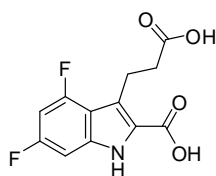
¹H-NMR (CD₃OD): δ 2,69 (t, 2H, ³J = 8,4 Hz, CH₂-CH₂); 3,73 (t, 2H, ³J = 8,4 Hz, CH₂-CH₂); 7,08 (dd, 1H, ⁴J = 0,8 Hz, ³J = 7,5 Hz, H-5); 7,20 (dd, 1H, ³J = 7,6 Hz, ³J = 8,1 Hz, H-6); 7,39 (dd, 1H, ⁴J = 0,7 Hz, ³J = 8,3 Hz, H-7); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 21,96 (CH₂-CH₂); 35,14 (CH₂-CH₂); 112,61 (C-7); 122,15 (C-6); 123,36 (C-3); 125,19 (C-2); 126,46 (C-5); 126,72 (C-4); 128,69 (C-3a); 138,55 (C-7a); 165,01 (CO₂H); 177,24 (CO₂H)

ESI-MS: 266,1 ([M-H]⁻); 268,0 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 98,3 %

6.5.5.7 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-4,6-difluor-1H-indol-2-carbonsäure (148, KL28)²⁵²



100 mg (0,31 mmol) Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4,6-fluor-1H-indol-2-carboxylat (**147**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 65 mg (1,55 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde anschließend aus heißem Ethylacetat : Hexan (1 : 1) umkristallisiert. Da keine ausreichende Reinheit erzielt werden konnte, wurde das Produkt anschließend über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 0,5 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 4,5 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 10 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol

(Gradientendauer: 35 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.²⁵²

Ausbeute: Vor HPLC: 81 mg (98 %)

Nach HPLC: 30 mg (26 %) (das Produkt liegt als Monotriethylamin-Salz vor)

Aussehen: farbloses Pulver

Smp.: > 250 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Methanol, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Hexan, Pentan

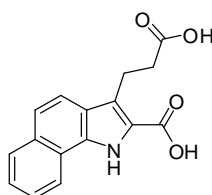
¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,32 (t, 9H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 2,67 (t, 2H, ³J = 8,2 Hz, CH₂-CH₂); 3,17 (q, 6H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 3,52 (t, 2H, ³J = 8,2 Hz, CH₂-CH₂); 6,56 (ddd, 1H, ⁴J = 2,1 Hz, ³J_{FH} = 9,9 Hz, ³J_{FH} = 11,6 Hz, H-5); 6,93 (dd, 1H, ⁴J = 2,1 Hz, ³J_{FH} = 9,4 Hz, H-7), (3 Signale, (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 22,54 (s, CH₂-CH₂); 36,74 (s, CH₂-CH₂); 95,39 (dd, ⁴J_{FC} = 4,4 Hz, ²J_{FC} = 26,0 Hz, C-7); 96,60 (dd, ²J_{FC} = 24,3 Hz, ²J_{FC} = 29,6 Hz, C-5); 114,75 (d, ²J_{FC} = 18,8 Hz, C-3a); 121,96 (s, C-3); 126,54 (s, C-2); 139,55 (pseudo-t, ³J_{FC} = 13,9 Hz, C-7a); 159,32 (dd, ³J_{FC} = 15,4 Hz, ¹J_{FC} = 250,3 Hz, C-4); 162,62 (dd, ³J_{FC} = 12,4 Hz, ¹J_{FC} = 241,0 Hz, C-6); 164,55 (s, CO₂H); 175,46 (s, CO₂H)

ESI-MS: 268,0 ([M-H]⁻)

Reinheit laut ESI-MS: 98,9 %

6.5.5.8 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-1*H*-benzo[*g*]indol-2-carbonsäure (**144**, KL21)²⁵²



56,9 mg (0,17 mmol) Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1*H*-benzo[*g*]indol-2-carboxylat (**143**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 30 mg (0,71 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde anschließend aus heißem Ethylacetat : Hexan (1 : 1) umkristallisiert. Da keine ausreichende Reinheit erzielt werden konnte, wurde das Produkt anschließend über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 3 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 27 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 10 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol

(Gradientendauer: 35 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.²⁵²

Ausbeute: 36 mg (77 %) als 1 : 1,3 – Triethylamin-Salz

Aussehen: weißer Feststoff

Smp.: 230 °C (Lit: 228-229 °C)²⁵²

Leicht löslich in: Methanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Hexan, Petrolether, Dichlormethan

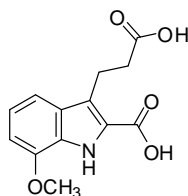
¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,29 (t, insg. 12H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 2,72 (t, 2H, ³J = 7,9 Hz, CH₂-CH₂); 3,13 (q, insg. 8H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 3,52 (t, 2H, ³J = 7,9 Hz, CH₂-CH₂); 7,44 – 7,47 (m, insg. 2H, 2 x H_{arom}); 7,52 – 7,56 (m, 1H, H_{arom}); 7,78 (d, 1H, ³J = 8,7 Hz; H_{arom}); 7,90 (d, 1H, ³J = 8,1 Hz; H_{arom}); 8,37 (d, 1H, ³J = 8,1 Hz; H_{arom}); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 21,80 (CH₂-CH₂); 36,78 (CH₂-CH₂); 120,53 – 133,93 (12 Signale, 12 x C_{arom}); 163,86 (CO₂H); 177,63 (CO₂H)

ESI-MS: 282,5 ([M-H]⁻); 284,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 96,1 %

6.5.5.9 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-7-methoxy-1*H*-indol-2-carbonsäure (250, KL23)²⁸⁸



39,8 mg (0,13 mmol) Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-7-methoxy-1*H*-indol-2-carboxylat (**249**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 16 mg (0,38 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde anschließend aus heißem Ethylacetat : Hexan (1 : 1) umkristallisiert. Da keine ausreichende Reinheit erzielt werden konnte, wurde das Produkt anschließend über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 2 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 18 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 10 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer: 35 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.²⁵²

Ausbeute: 16 mg (40 %) als 1 : 2,9 – Triethylamin-Salz

Aussehen: weißer Feststoff

Smp.: 240°C (Lit: 240°C)²⁸⁹

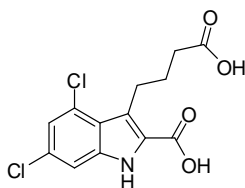
Leicht löslich in: Methanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Hexan, Petrolether

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,35 (t, insg. 26H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 2,67 (t, 2H, ³J = 8,0 Hz; CH₂-CH₂); 3,24 (q, insg. 17H, ³J = 7,3 Hz, CH₂-CH₃(Triethylamin)); 3,41 (t, 2H, ³J = 8,0 Hz; CH₂-CH₂); 4,00 (s, 3H, O-CH₃); 6,79 (d, 1H, ³J = 7,4 Hz; H_{arom}); 7,04 (dd, 1H, ³J = 7,7 Hz; ³J = 8,1 Hz; H-5); 7,30 (dd, 1H, ³J = 8,1 Hz; H_{arom}); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 21,90 (CH₂-CH₂); 36,60 (CH₂-CH₂); 56,14 (O-CH₃); 105,46 (C-6); 113,91 (C-4); 118,51 (C-3); 121,68 (C-5); 123,99 (C-2); 128,98 (C-7a); 130,45 (C-3a); 148,50 (C-7); 165,62 (CO₂H); 177,57 (CO₂H)

6.5.5.10 Darstellung von 3-(3-Carboxypropyl)-4,6-dichlor-1H-indol-2-carbonsäure (**196**, KL72)²⁹⁰



81,3 mg (0,24 mmol) 4-(4,6-Dichlor-2-(ethoxycarbonyl)-1H-indol-3-yl)butansäure (**195**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 99 mg (2,36 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift.²⁵²

Ausbeute: 68 mg (91 %)

Aussehen: weißer Feststoff

Smp.: 220 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Methanol, Ethylacetat, DMSO

Schwer löslich in: Hexan, Petrolether, Wasser

¹H-NMR (CD₃OD): δ 2,01 – 2,05 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,41 (t, 2H, ³J = 7,7 Hz, CH₂-CH₂-CH₂); 3,45 (t, 2H, ³J = 7,7 Hz, CH₂-CH₂-CH₂); 7,09 (d, 1H, ⁴J = 1,7 Hz, H-7); 7,41 (d, 1H, ⁴J = 1,7 Hz, H-5); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

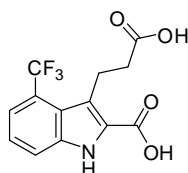
¹³C-NMR (CD₃OD): δ 25,35 (CH₂-CH₂-CH₂); 28,97 (CH₂-CH₂-CH₂); 35,06 (CH₂-CH₂-CH₂); 112,25 (C-7); 122,36 (C-5); 124,21 (C-3); 124,76 (C-2); 127,65 (C-3a); 129,68 (C-6); 131,37 (C-4); 139,32 (C-7a); 164,81 (CO₂H); 177,91 (CO₂H)

ESI-MS: 314,0 ($[M-H]^-$)

Reinheit laut ESI-MS: 98,3 %

Elementaranalyse: ($C_{13}H_{11}Cl_2NO_4 \cdot 0,25 \text{ EtOAc}$): N: 4,148 % (theoret.: 4,14 %); C: 49,86 % (49,72 %); H: 3,947 % (3,87 %); C / N: 12,020 (12,010)

6.5.5.11 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carbonsäure (152, KL64)²⁵²



150 mg (0,42 mmol) Ethyl-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-(trifluormethyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**151**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 176 mg (4,2 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 91 mg (72 %)

Aussehen: hellgelber Feststoff

DC: $R_f = 0,73$ (25 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 250 °C (Lit: 260 °C)²⁵²

Leicht löslich in: Ethylacetat, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Hexan, Petrolether, Dichlormethan

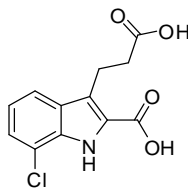
1H -NMR (CD_3OD): δ 2,61 (t, 2H, $^3J = 8,5 \text{ Hz}$, $\underline{CH_2-CH_2}$); 3,51 (t, 2H, $^3J = 8,5 \text{ Hz}$, $\underline{CH_2-CH_2}$); 7,38 (pseudo-t, 1H, $^3J = 7,9 \text{ Hz}$, H-6); 7,52 (d, 1H, $^3J = 7,3 \text{ Hz}$, H-5); 7,74 (d, 1H, $^3J = 8,3 \text{ Hz}$, H-7); (3 Signale (NH, 2 x CO_2H) nicht detektierbar)

^{13}C -NMR (CD_3OD): δ 21,67 (s, $\underline{CH_2-CH_2}$); 36,31 (s, $CH_2-\underline{CH_2}$); 118,47 (s, C-7); 120,02 (q, $^3J_{FC} = 6,6 \text{ Hz}$, C-5); 122,26 (s, C-3); 123,23 (s, C-3a); 123,62 (q, $^2J_{FC} = 32,6 \text{ Hz}$, C-4); 124,59 (s, C-6); 126,51 (q, $^1J_{FC} = 270,9 \text{ Hz}$, $-CF_3$); 128,00 (s, C-2); 139,05 (s, C-7a); 164,71 (s, CO_2H); 177,39 (s, CO_2H)

ESI-MS: 300,3 ($[M-H]^-$); 302,0 ($[M+H]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 98,4 %

Elementaranalyse: ($C_{13}H_{10}F_3NO_4 \cdot 0,15 \text{ EtOAc}$): N: 4,355 % (theoret.: 4,45 %); C: 51,14 % (51,95 %); H: 3,832 % (3,59 %); C / N: 11,743 (11,674)

6.5.5.12 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-7-chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (139, KL91)²⁵²

355,3 mg (1,10 mmol) Ethyl-3-(2-Carboxyethyl)-7-chlor-1*H*-indol-2-propionat (**137**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 461,1 mg (11,00 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.²⁵²

Ausbeute: 268 mg (91 %)

Aussehen: weißer Feststoff

Smp.: 250 °C (Zers.) (Lit: 255-256 °C)²⁵²

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Hexan, Heptan, Petrolether

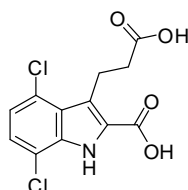
¹H-NMR (CD₃OD): δ 2,68 (t, 2H, $^3J = 7,9$ Hz, CH₂-CH₂); 3,43 (t, 2H, $^3J = 7,9$ Hz, CH₂-CH₂); 7,10 (dd, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, $^3J = 7,6$ Hz, H-5); 7,32 (dd, 1H, $^4J = 0,7$ Hz, $^3J = 7,5$ Hz, H-6); 7,69 (dd, 1H, $^4J = 0,7$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz; H-4); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): 21,75 (CH₂-CH₂); 36,37 (CH₂-CH₂); 118,65 (C-7); 120,57 (C-4); 121,84 (C-6); 124,71 (C-3); 125,78 (C-5); 126,81 (C-2); 130,76 (C-3a); 135,18 (C-7a); 164,95 (CO₂H); 177,27 (CO₂H)

ESI-MS: 266,3 ([M-H]⁻)

Reinheit laut ESI-MS: 100 %

Elementaranalyse: (C₁₂H₁₀ClNO₄): N: 5,178 % (theoret.: 5,23 %); C: 53,68 % (53,85 %); H: 3,822 % (3,77 %); C/N: 10,367 (10,296)

6.5.5.13 Darstellung von 3-(2-Carboxyethyl)-4,7-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (140, KL94)

49,8 mg (0,15 mmol) Ethyl-3-(2-Carboxyethyl)-4,7-dichlor-1*H*-indol-2-propionat (**138**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 63,3 mg (1,51 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 31 mg (68 %)

Aussehen: weißer Feststoff

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Hexan, Heptan, Petrolether

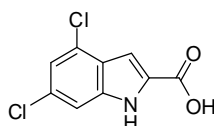
¹H-NMR (CD₃OD): 2,66–2,72 (m, 2H, CH₂-CH₂); 3,72 (t, 2H, CH₂-CH₂); 7,09 (dd, 1H, ⁴J = 0,9 Hz, ³J = 8,1 Hz, H-6); 7,27 (d, 1H, ³J = 8,1 Hz, H-5); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 21,79 (CH₂-CH₂); 37,28 (CH₂-CH₂); 117,89 (C-7); 122,92 (C-3); 124,37 (C-6); 125,88 (C-5); 126,39 (C-4); 127,52 (C-2); 128,24 (C-3a); 136,24 (C-7a); 164,41 (CO₂H); 176,19 (CO₂H)

ESI-MS: 300,00 ([M-H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 99,7 %

6.5.5.14 Darstellung von 4,6-Dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (200, KL99)²⁸⁵



100 mg (0,39 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**199**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 162,6 mg (3,9 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.²⁵²

Ausbeute: 88 mg (98 %)

Aussehen: weißer Feststoff

Smp.: 236–237 °C (Zers.) (Lit: 238-239 °C)²⁸⁵

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Hexan, Heptan, Petrolether

¹H-NMR (CD₃OD): δ 7,16 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H-3); 7,19 (d, 1H, ⁴J = 0,9 Hz, H-7); 7,45 (dd, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, ⁴J = 0,9 Hz, H-5); (2 Signale (NH, CO₂H) nicht detektierbar)

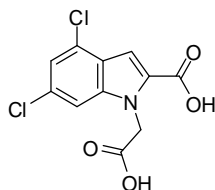
¹³C-NMR (CD₃OD): δ 107,22 (C-3); 112,33 (C-7); 121,56 (C-5); 126,60 (C-2); 129,13 (C-3a); 131,48 (C-6); 131,56 (C-4); 139,39 (C-7a); 164,38 (CO₂H)

ESI-MS: 229,1 ([M-H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 96,0 %

Elementaranalyse: (C₉H₅Cl₂NO₂ • 0,15 EtOAc): N: 5,835 % (theoret.: 5,76 %); C: 47,82 % (47,40 %); H: 2,669 % (2,57 %); C / N: 8,195 (8,229)

6.5.5.15 Darstellung von 1-(Carboxymethyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (205, KL110)



70,0 mg (0,30 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl-1*H*-indol-2-carboxylat (**204**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 20,3 mg (2,96 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, anschließend mit Wasser verdünnt, mit konzentrierter Essigsäure angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 58 mg (100 %)

Aussehen: farbloser Feststoff

Smp.: 248 °C (Zers.)

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, DMSO, Ethylacetat

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Heptan

¹H-NMR (CD₃OD): δ 5,39 (s, 2H, CH₂); 7,24 (d, 1H, ⁴*J* = 1,5 Hz, H-7); 7,35 – 7,36 (br, 1H, H-7); 7,55 – 7,57 (br, 1H, H-3); (2 Signale (2 x CO₂H) nicht detektierbar)

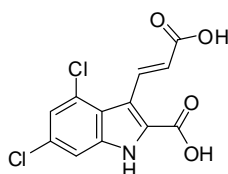
¹³C-NMR (CD₃OD): δ 47,78 (CH₂); 109,79 (C-7); 110,85 (C-3); 122,23 (C-5); 125,27 – 141,71 (4 Signale, 4 x C_{arom}); 164,52 (C-7a); 172,51 (CO₂H); 175,51 (CO₂H)

ESI-MS: 286,0 ([M-H][−])

Reinheit laut ESI-MS: 99,5 %

Elementaranalyse: (C₁₁H₇Cl₂NO₄ • 1,25 AcOH): N: 3,975 % (theoret.: 4,02 %); C: 43,58 % (44,85 %); H: 3,485 % (3,18 %); C / N: 10,964 (11,157)

6.5.5.16 Darstellung von 3-(2-Carboxyvinyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (212, KL118)²⁹¹



66,8 mg (0,19 mmol) Ethyl-4,6-dichlor-3-(ethoxy-3-oxoprop-1-enyl)-1*H*-indol-2-carboxylat (**209**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 23,6 mg (0,56 mmol) Lithiumhydroxid-

Monohydrat über Nacht bei Raumtemperatur umgesetzt. Da keine vollständige Umsetzung des Eduktes erreicht worden war, wurden erneut 28 mg (0,67 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat hinzugefügt und eine weitere Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Vorschrift O beschrieben. Anschließend wurde das Produkt über eine RP-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde die Substanz in 2 ml Methanol : Triethylamin (98,5 : 1,5) und 8 ml Wasser : Triethylamin (98,5 : 1,5) gelöst und mit einem Lösungsmittelgradienten von 20 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol (Gradientendauer: 40 min) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.²⁵²

Ausbeute: 42 mg (47 %) eines 1 : 4 (*E,Z*)-Diastereomergemischs (siehe Abbildung 6.6) als Triethylamin-Salz (pro Molekül 1,66 Moleküle Triethylamin)

Aussehen: hellgelber Feststoff

DC: $R_f = 0,10$ (50 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 84 °C

Leicht löslich in: Methanol, Ethylacetat, Ethanol, DMSO

Schwer löslich in: Dichlormethan, Chloroform, Wasser

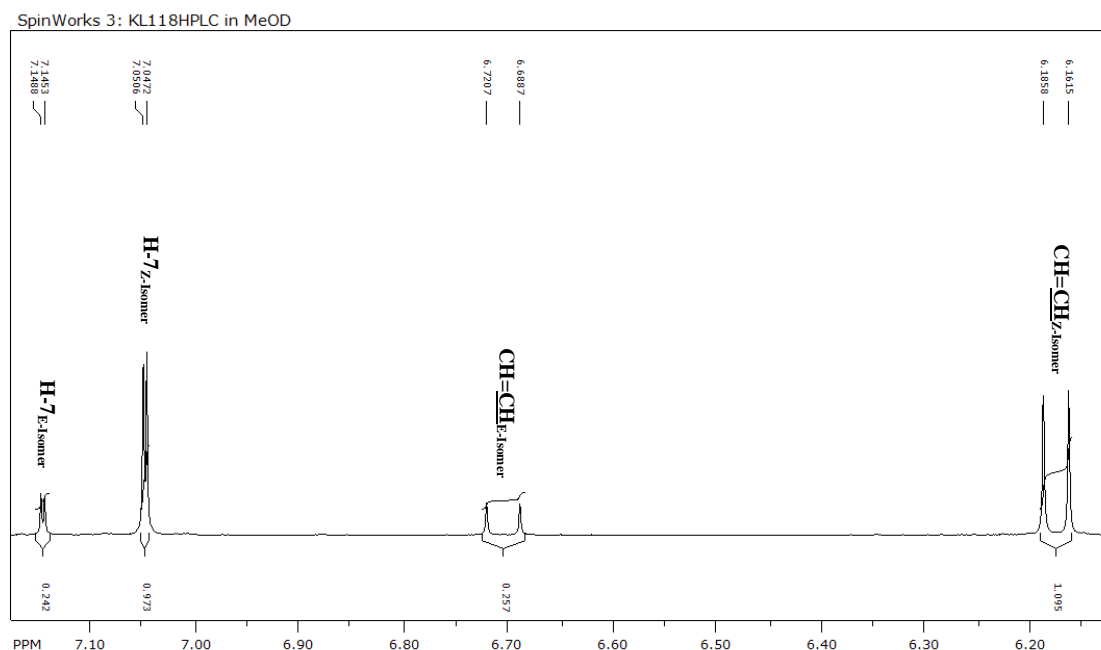


Abbildung 6.6: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum der Verbindung 212.

^1H -NMR (CD_3OD): δ 1,30 (t, insg. 15H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ (Triethylamin)); 3,17 (q, insg. 10H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ (Triethylamin)); 6,17 (d, 1H, $^3J = 12,1$ Hz, H-9_Z-Isomer); 6,70 (d, 0,25H, $^3J = 16,0$ Hz, H-9_E-Isomer); 7,05 (d, 1H, $^3J = 1,7$ Hz, H-7_Z-Isomer); 7,15 (d, 0,25H, $^3J = 1,8$ Hz, H-7_E-Isomer); 7,40 (d, 1H, $^3J = 1,7$ Hz, H-5_Z-Isomer); 7,44 (d, 0,25H, $^3J = 1,7$ Hz,

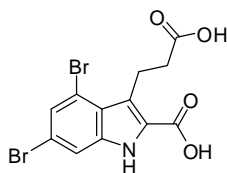
H-5_E-Isomer); 7,47 (d, 1H, ³J = 12,2 Hz, H-8_Z-Isomer); 8,66 (d, 1H, ³J = 16,0 Hz, H-8_E-Isomer); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ 9,45 (CH₂-CH₃(Triethylamin)); 47,91 (CH₂-CH₃(Triethylamin)); 111,93 (C-7); 112,19 (C-9_E-Isomer); 114,73 (C-9_Z-Isomer); 122,14 (C-5); 123,24 (C-3); 124,80 (C-2); 125,91 (C-3a); 129,53 (C-6); 129,90 (C-4); 134,46 (C-8_E-Isomer); 136,42 (C-8_Z-Isomer); 138,21 (C-7); 168,77 (CO₂H); 172,16 (CO₂H)

ESI-MS: 298,1 ([M-H]⁻); 300,0 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 96,4 %

6.5.5.17 Darstellung von 4,6-Dibrom-3-(2-carboxyethyl)-1H-indol-2-carbonsäure (174, KL126)



120 mg (0,27 mmol) Ethyl-4,6-dibrom-3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1H-indol-2-carboxylat (**173**) wurden nach modifizierter Vorschrift O mit 112,6 mg (2,68 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 104 mg (99 %)

Aussehen: hellbeiges Pulver

Smp.: 259°C

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol, Ethylacetat

Schwer löslich in: Petrolether, Wasser, Hexan

¹H-NMR (CD₃OD): δ 2,67 (t, 2H, ³J = 8,4 Hz, CH₂-CH₂); 3,71 (t, 2H, ³J = 8,4 Hz, CH₂-CH₂); 7,42 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H-7); 7,62 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H-5); (3 Signale (NH, 2 x CO₂H) nicht detektierbar)

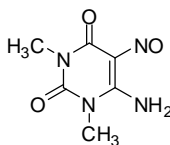
¹³C-NMR (CD₃OD): δ 21,38 (CH₂-CH₂); 37,48 (CH₂-CH₂); 115,94 (C-7); 117,01 (C-4); 118,84 (C-6); 123,90 (C-3); 125,49 (C-2); 127,86 (C-3a); 128,21 (C-5); 139,60 (C-7a); 164,60 (CO₂H); 170,05 (CO₂H)

ESI-MS: 390,0 ([M-H]⁻); 392,0 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 96,3 %

6.6 PROJEKT 2B: SYNTHESE VON XANTHIN-DERIVATEN ALS LIGANDEN FÜR DEN GPR17

6.6.1.1 Darstellung von 6-Amino-1,3-dimethyl-5-nitrosouracil (**226**, KL41)²⁹²



4,02 g (25,8 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyluracil (**225**) wurden bei 75 °C in 160 ml 50-prozentiger Essigsäure gelöst. Die Reaktion wurde auf 50 °C abgekühlt und es wurden langsam 3,56 g (51,6 mmol) Natriumnitrit-Pulver hinzugefügt. Daraufhin verfärbte sich die Lösung violett und bildete einen Niederschlag. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen und rührte eine weitere Stunde. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.²⁹²

Ausbeute: 4,60 g (96 %) (Lit.: 99 %)²⁹²

Aussehen: violetter Feststoff

Smp.: 231 °C (Lit: 233 °C)²⁹³

Leicht löslich in: DMSO

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Wasser, Isopropanol

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,24 (s, 3H, CH₃); 3,26 (s, 3H, CH₃); 9,03 (s, 1H, NH); 12,96 (s, 1H, NH)

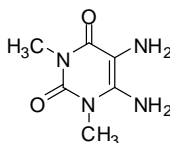
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 27,97 (CH₃); 28,80 (CH₃); 139,29 (C-5); 146,24 (C-6); 149,53 (C-4); 160,36 (C-2)

ESI-MS: 182,9 ([M-H]⁻); 185,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 99,9 %

Elementaranalyse: (C₆H₈N₄O₃ • H₂O): N: 26,72 % (theoret.: 27,71 %); C: 34,71 % (35,65 %); H: 4,864 % (4,99 %); C / N: 1,299 (1,334)

6.6.1.2 Darstellung von 5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**227**, KL42)²⁹²



1,10 g (6,00 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyl-5-nitrosouracil (**226**) wurden in 40 ml 14,5-prozentiger wässriger Ammoniak-Lösung suspendiert und auf 70 °C erwärmt. Es entstand

eine rote Lösung. Die Lösung wurde auf 50 °C abgekühlt und es wurden 3,13 g (18,0 mmol) Natriumdithionit-Pulver zugefügt. Daraufhin entfärbte sich die Lösung. Anschließend wurde das Volumen auf etwa die Hälfte eingengt und auf 0 °C gekühlt. Die Reaktion wurde bei 0 °C 30 min stehen gelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet.²⁹²

Ausbeute: 650 mg (64 %) (Lit.: 58 %)²⁹²

Aussehen: hellgelber Feststoff

DC: $R_f = 0,32$ (40 % Dichlormethan in Ethanol)

Leicht löslich in: DMSO

Schwer löslich in: Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Wasser, Isopropanol

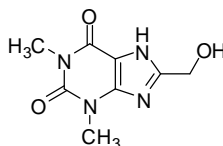
¹H-NMR (CDCl₃): δ 2,34 (s, 2H, NH₂); 3,35 (s, 3H, CH₃); 3,44 (s, 3H, CH₃); 4,85 (s, 2H, NH₂)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 28,20 (CH₃); 29,42 (CH₃); 95,54 (C-5); 149,08 (C-6 und C-2); 161,86 (C-4)

ESI-MS: 168,9 ([M-H]⁻); 171,1 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 100 %

6.6.1.3 Darstellung von 8-Hydroxymethyltheophyllin (229, KL45)^{263,264}



Methode A:

250 mg (1,47 mmol) 5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**227**) wurden mit 218 mg (2,87 mmol) Glycolsäure (**228**) verrieben, bei 80 °C geschmolzen und anschließend unter Rückfluss mit 5-prozentiger Natriumhydroxid-Lösung erhitzt. Durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure wurde die Lösung dann auf pH 4 eingestellt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt.²⁶³

Ausbeute: 51 mg (16 %)

Aussehen: rosafarbener Feststoff

DC: $R_f = 0,73$ (40 % Dichlormethan in Ethanol)

Smp.: 239 °C (Lit: 240 °C)²⁹⁴

Mäßig löslich in: Isopropanol

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Dichlormethan, Ethylacetat, Hexan

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 3,22 (s, 3H, CH_3); 3,42 (s, 3H, CH_3); 4,49 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{-OH}}$); (2 Signale (NH, OH) nicht detektierbar)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 27,82 (CH_3); 29,83 (CH_3), 56,96 (CH_2), 106,55 (C-5), 148,02 (C-4); 151,36 (C-8); 153,84 (C=O); 154,30 (C=O)

ESI-MS: 208,9 ($[\text{M-H}]^-$); 211,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,1 %

Methode B:

Eine Mischung aus 250 mg (1,47 mmol) 5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**227**) und 447 mg (5,88 mmol) Glycolsäure (**228**) wurde bei 100 °C für eine Stunde gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde eine Lösung aus Ethanol und Wasser (1 : 1) zugefügt, gefolgt von tropfenweise Natronlauge, bis der pH-Wert der Lösung 12 erreichte. Die resultierende Lösung wurde zweieinhalb Stunden unter Rückfluss erhitzt, auf Raumtemperatur gekühlt und langsam mit Essigsäure auf pH 5 angesäuert. Bei Lagerung im Kühlschrank (5 °C) fiel das Produkt teilweise aus. Dieses wurde abfiltriert und aus Ethanol : Wasser (1 : 1) umkristallisiert.²⁶⁴

Ausbeute: 84,6 mg (27 %)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,73$ (40 % Dichlormethan in Ethanol)

Smp.: 240 °C (Lit: 240 °C)²⁹⁴

Mäßig löslich in: Isopropanol

Schwer löslich in: Wasser, Methanol, Dichlormethan, Ethylacetat, Hexan

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 3,22 (s, 3H, CH_3); 3,42 (s, 3H, CH_3); 4,49 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{-OH}}$); 5,54 (s, 1H, OH); 13,29 (s, 1H, NH)

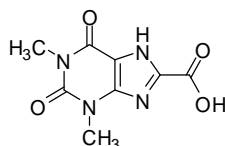
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 27,81 (CH_3); 29,82 (CH_3), 56,97 (CH_2), 106,50 (C-5), 148,07 (C-4); 151,35 (C-8); 153,74 (C=O); 154,30 (C=O)

ESI-MS: 208,9 ($[\text{M-H}]^-$); 211,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 99,5 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$): N: 24,72 % (theoret.: 25,56 %); C: 43,76 % (43,84 %); H: 4,937 % (5,06 %); C / N: 1,770 (1,715)

6.6.1.4 Darstellung von 8-Carboxytheophyllin (**230**, **KL60**)²⁶⁶



3,15 g (15 mmol) 8-Hydroxymethyltheophyllin (**229**) wurden in 7,5 ml Wasser und 15 ml 5-prozentiger Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Unter ständigem Rühren wurden 3,15 g (19,9 mmol) Kaliumpermanganat in 56 ml Wasser so zugefügt, dass die Temperatur 40 °C nicht überstieg. Danach wurde die violett-braune Suspension 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Braunstein wurde abfiltriert und mit heißem Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde anschließend mit Aktivkohle gerührt, bis die Lösung farblos war. Die Suspension wurde über eine Schicht Celite filtriert und das Filtrat mit konzentrierter Salzsäure in der Hitze auf pH 1 angesäuert. Im Kühlschrank fiel über Nacht ein Niederschlag aus, der mit wenig Eiswasser, dann mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde.²⁶⁶

Ausbeute: 1,85 g (55 %) (Lit: 82 %)²⁶⁶

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,33$ (50 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 280 °C (Zers.)

Leicht löslich in: DMSO

Schwer löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, Petrolether, Wasser, Hexan

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,23 (s, 3H, CH₃); 3,44 (s, 3H, CH₃); (2 Signale (NH, CO₂H) nicht detektierbar)

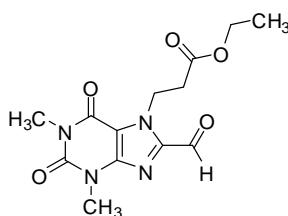
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 28,06 (CH₃); 30,06 (CH₃); 109,80 (C-5); 140,43 (C-8); 147,07 (C-4); 151,25 (C=O); 154,79 (C=O); 159,18 (CO₂H)

ESI-MS: 223,1 ([M-H]⁻); 225,3 ([M+H]⁺)

Reinheit laut ESI-MS: 98,4 %

Elementaranalyse: (C₈H₈N₄O₄ • 0,75 H₂O): N: 24,43 % (theoret.: 23,57 %), C: 42,18 % (40,43 %), H: 4,097 % (4,03 %), C / N: 1,727 (1,715)

6.6.1.5 Darstellung von Ethyl-3-(8-formyl-theophyllin-7-yl)propanoat (**238**, KL68)



121 mg (0,58 mmol) 8-Formyltheophyllin (**235**) wurden zusammen mit 480 mg (3,47 mmol) Kaliumcarbonat, 39,6 mg (0,17 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid und 30 ml Aceton 30 min unter Rückfluss erhitzt. Tropfenweise wurden 0,9 ml (6,96 mmol) 3-Brompropionsäureethylester hinzugegeben. Die Suspension wurde fünf Tage unter refluxierenden Bedingungen gerührt, wobei jeden Tag erneut 150 μ l (1,16 mmol) 3-Brompropionsäureethylester hinzugege-

ben wurden. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde der Verlauf der Reaktion kontrolliert. Die Suspension wurde anschließend filtriert und das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert.²⁶¹

Ausbeute: 98,3 mg (55 %)

Aussehen: farbloses Pulver

DC: $R_f = 0,62$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Chloroform, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Ethanol, Methanol, Petrolether

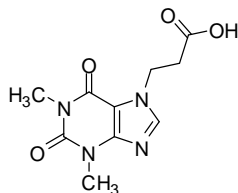
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,26 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,87 (t, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,41 (s, 3H, CH_3); 3,60 (s, 3H, CH_3); 4,09 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 5,06 (t, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 9,90 (s, 1H, CHO)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14,05 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 28,34 (CH_3); 29,87 (CH_3); 34,85 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 42,22 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 60,99 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 110,55 (C-5); 143,47 (C-8); 147,74 (C-4); 151,30 (C=O); 155,58 (C=O); 170,02 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$); 182,58 (CHO)

ESI-MS: 307,1 ($[\text{M-H}]^-$); 309,3 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 94,4 %

6.6.1.6 Darstellung von Theophyllin-7-propionsäure (**234**, **KL74**)²⁹⁵



24,9 mg (0,09 mmol) Ethyl-3-(theophyllin-7-yl)propanoat (**233**) wurden nach Vorschrift O verseift. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.²⁵²

Ausbeute: 13,9 mg (62 %)

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,41$ (25 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: Methanol, DMSO

Schwer löslich in: Wasser, Hexan, Petrolether

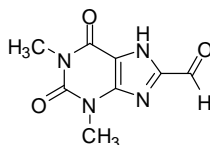
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 2,97–2,99 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,39 (s, 3H, CH_3); 3,56 (s, 3H, CH_3); 4,58 (t, 2H, $^3J = 6,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 7,96 (s, 1H, H-8); (1 Signal (CO_2H) nicht detektierbar)

^{13}C -NMR (CD_3OD): δ 28,62 (CH_3); 30,15 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 30,46 (CH_3); 44,36 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 108,20 (C-6); 129,97 (C-8); 144,50 (C-5), 150,52 (C=O); 153,54 (C=O); 156,76 (CO_2H)

ESI-MS: 250,9 ($[\text{M-H}]^-$); 253,1 ($[\text{M+H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 92,8 %

6.6.1.7 Darstellung von Theophyllin-8-carbaldehyd (235, KL85)²⁶³



546,8 mg (2,60 mmol) 8-Hydroxymethyltheophyllin (**229**) wurden in 11 ml Eisessig bei 80 °C gelöst. Es wurden 272 mg (0,91 mmol) fein pulverisiertes Natriumdichromat-Dihydrat in kleinen Portionen unter Rühren innerhalb von 15 min zugegeben. Die Mischung wurde weitere 30 min bei 80 °C gerührt und anschließend über Nacht abgekühlt. In dieser Zeit bildete sich weiße Kristalle, die abfiltriert und mit Eisessig gewaschen wurden. Anschließend wurde so lange mit kaltem Wasser gewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos blieb. Danach wurde zweimal mit Methanol gewaschen und der Niederschlag im Vakuum getrocknet.²⁶³

Ausbeute: 163,4 mg (30 %) (Lit: 60 %)²⁶³

Aussehen: weißer Feststoff

DC: R_f = 0,45 (10 % Ethanol in Dichlormethan)

Leicht löslich in: DMSO

Schwer löslich in: Chloroform, Dichlormethan, Methanol, Petrolether, Wasser, Hexan

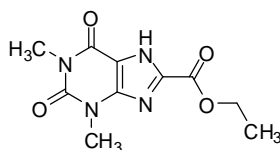
^1H -NMR (DMSO-d_6): δ 3,25 (s, 3H, CH_3); 3,46 (s, 3H, CH_3); 9,73 (s, 1H, CHO); 14,77 (s, 1H, NH)

^{13}C -NMR (DMSO-d_6): δ 28,89 (CH_3); 31,08 (CH_3); 85,97 (C-5); 145,94 (C-4); 151,93 (C-8); 156,28 (C=O); 156,29 (C=O); 182,66 (CHO)

ESI-MS: 206,9 ($[\text{M-H}]^-$)

Reinheit laut ESI-MS: 97,7 %

6.6.1.8 Darstellung von Ethyl-theophyllin-8-carboxylat (236, KL88)²⁹⁶



Zu 500 µl Ethanol, wurden bei –20 °C langsam 110 µl (1,48 mmol) frisch destilliertes Thionylchlorid so zugetropft, dass die Temperatur –10 °C nicht überstieg. Dann wurden 111 mg (0,49 mmol) Theophyllin-8-ameisensäure (**230**) hinzugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur zwei Tage gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und ohne Aufreinigung weiterverwendet. Die Mutterlauge wurde anschließend im Vakuum eingedampft und säulenchromatographisch (Dichlormethan : Ethanol 95 : 5) gereinigt.²⁶⁷

Ausbeute: 85,4 mg (69 %)

Aussehen: weißes Pulver

DC: $R_f = 0,40$ (5 % Ethanol in Dichlormethan)

Smp.: 279 °C (Lit.: 277-279 °C)²⁹⁷

Leicht löslich in: Chloroform, Dichlormethan, DMSO

Schwer löslich in: Wasser

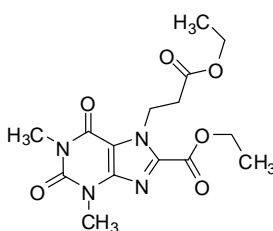
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,44 (t, 3H, ³J = 7,2 Hz, CH₂-CH₃); 3,50 (s, 3H, CH₃); 3,65 (s, 3H, CH₃); 4,51 (q, 2H, ³J = 7,2 Hz, CH₂-CH₃); 12,54 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 14,25 (CH₂-CH₃); 28,62 (CH₃); 30,44 (CH₃); 63,08 (CH₂-CH₃); 109,34 (C-5); 140,15 (C-8); 148,29 (C-6); 151,44 (C=O); 155,49 (C=O); 157,94 (C=O)

ESI-MS: 250,9 ([M-H]⁻)

Reinheit laut ESI-MS: 99,7 %

6.6.1.9 Darstellung von Ethyl-7-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-theophyllin-8-carboxylat (**239**, KL93)



85,4 mg (0,34 mmol) Ethyl-theophyllin-8-carboxylat (**236**) wurden zusammen mit 280,8 mg (2,03 mmol) Kaliumcarbonat, 23,1 mg (0,10 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid und 5 ml Aceton 30 min unter Rückfluss erhitzt. Tropfenweise wurden 521 µl (4,06 mmol) 3-Brompropionsäureethylester hinzugegeben und anschließend drei Tage unter refluxierenden Bedingungen gerührt, wobei jeden Tag erneut 85 µl (0,68 mmol) 3-Brompropionsäureethylester hinzugegeben werden. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde der Verlauf der Reaktion kontrolliert. Die Mischung wurde filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde anschließend säulenchromatographisch (100 % Ethylacetat) aufgereinigt.²⁶¹

Ausbeute: 89,0 mg (75 %), außerdem konnten 14,6 mg nicht umgesetztes Edukt zurück gewonnen werden

Aussehen: weißer Feststoff

DC: $R_f = 0,63$ (100 % Ethylacetat)

Smp.: 128 °C

Leicht löslich in: Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO, Chloroform

Schwer löslich in: Methanol, Ethanol, Wasser,

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,20 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,44 (t, 3H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 2,88 (t, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,40 (s, 3H, CH_3); 3,59 (s, 3H, CH_3); 4,09 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 4,61 (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 5,08 (t, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ [ppm]: 14,05 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 14,12 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 28,21 (CH_3); 30,01 (CH_3); 35,02 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 42,92 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 60,88 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 62,82 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 109,75 (C-5); 139,18 (C-4); 147,03 ($\text{C}(2)=\text{O}$); 151,37 (C-8); 155,19 ($\text{C}(6)=\text{O}$); 158,343 ($\text{C}=\text{O}$); 170,12 ($\text{CH}_2\text{-C}=\text{O}$)

ESI-MS: 353,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Reinheit laut ESI-MS: 97,0 %

Elementaranalyse: ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 0,25 \text{ EtOAc}$): N: 15,10 % (theoret.: 14,97 %), C: 51,23 % (51,33 %), H: 5,755 % (5,92 %), C/N: 3,393 (3,429)

6.7 FUNKTIONELLE STUDIEN AM HUMANEN GPR17-REZEPTOR

Alle biologischen Untersuchungen wurden von Dr. Andreas Spinrath (AG Kostenis, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) und Dr. Aliaa Abdelrahman durchgeführt. Die Testung der Verbindungen erfolgte in allen Assays einerseits an rekombinanten, humanen GPR17-1321N1-Astrocytom-Zellen, die durch retrovirale Transfektion erzeugt wurden und den GPR17-Rezeptor stabil exprimieren. Andererseits wurden die Verbindungen an rekombinanten GPR17-Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), die durch Transfektion mit den Flp-InTM T-RexTM Expressionssystem hergestellt wurden und den GPR17-Rezeptor stabil exprimieren, getestet.¹⁴⁴

6.7.1 MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUM-AUSSCHÜTTUNG¹⁴⁴

Die Testung der Indol-Verbindungen am humanen GPR17-Rezeptor wurden von Dr. Andreas Spinrath und Dr. Aliaa Abdelrahman durchgeführt.

Die Zellen zweier, konfluent bewachsener 175 cm² Zellkulturflaschen wurden zunächst einmal mit PBS-Puffer gewaschen, mit einer Trypsin / EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und in Medium aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂, wur-

den die Zellen zentrifugiert, in Krebs-HEPES-Puffer (KHP) resuspendiert und unter Lichtausschluss mit einem der zwei verfügbaren Fluoreszenz-Farbstoffe in Gegenwart des amphiphilen Poloxamers Pluronic® F-127 versetzt. Bei den beiden Farbstoffen handelte es sich um Oregon Green® BAPTA-1 / AM und Fura-2 / AM. Die Zell-Farbstoff-Mischung wurde bei 28 °C und 700 rpm in einem Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, D-22339 Hamburg) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit KHP gewaschen und anschließend wurden je 180 µl der Zellsuspension pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. In eine weitere 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 35 µl einer 10-fach konzentrierten Agonist-Lösung vorgelegt. Beide Platten wurden im NOVOstar® Fluorometer 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wurde dem Assay ein Signalweg-Hemmstoff zugesetzt, wurde die Inkubationszeit so angepasst, dass die Fluoreszenz-Messung mit der Inhibitionswirkung übereinstimmte. Je 20 µl Agonist-Lösung wurden dann durch die Injektions-Einheit des NOVOstar®-Gerätes von der Vorlage-platte in die Messplatte injiziert und anschließend die Fluoreszenz vermessen.¹⁴⁴

6.7.2 MESSUNG DER ANREICHERUNG VON RADIOAKTIVEM INOSITOLTRIS-PHOSPHAT¹⁴⁴

Die Testung der Indol-Verbindungen am humanen GPR17-Rezeptor wurden von Dr. Andreas Spinrath durchgeführt.

40000 rekombinante GPR17-CHO-Zellen bzw. 30000 rekombinante GPR17-1321N1-Astrocytomzellen wurden in 100 µl Kulturmedium in einer 96-Well-Zellkultur-Platte ausgesät und mit 0,5 µCi (18500 Bq) [2-³H]myo-Inositol pro Well versetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl HBSS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und 80 µl HBSS-Puffer mit 10 mM Lithiumchlorid wurden zugefügt. Die Rezeptor-Aktivierung erfolgte durch Zugabe von 20 µl einer 5-fach konzentrierten Agonist-Lösung in HBSS-Puffer ergänzt mit 10 mM Lithiumchlorid. Anschließend wurden die Zellen 45 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und es wurden 50 µl einer 10 mM eiskalten Ameisensäure pro Well zugefügt. Nach 90 min Inkubation auf Eis, wurden 20 µl des resultierenden Zellextraktes zu 80 µl Yttrium-Silikat-Szintillations-Kügelchen gegeben und 60 min bei 4 °C geschüttelt. Die Szintillations-Kügelchen wurden nach unten zentrifugiert und in einem TopCount NXTTM Szintillationszähler vermessen.¹⁴⁴

6.7.3 MESSUNG DER DYNAMISCHEN MASSEN-UMVERTEILUNG¹⁴⁴

Die Testung der Indol-Verbindungen am humanen GPR17-Rezeptor wurden von Dr. Andreas Spinrath durchgeführt.

Zur Messung der dynamischen Massen-Umverteilung (*dynamic mass redistribution*, DMR) wurde eine Beta-Version des Corning® Epic® Systems (Corning® Incorporated, NY 14831, USA) verwendet.

Am Tag vor der Messung wurden 12500 rekombinante GPR17-1321N1-Astrocytomzellen pro Well bzw. 15000 rekombinante GPR17-CHO-Zellen pro Well (in 40 µl Medium pro Well) in einer Epic® Senso Mikrotiterplatte ausgesät und anschließend 16 – 20 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. In dieser Zeit setzen sich die Zellen auf dem Boden der Mikrotiterplatte ab und bilden dort eine Monoschicht. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit Assay-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und 30 µl Assay-Puffer wurden zugefügt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Schließlich wurden 20 µl Assay-Puffer in die Wells gegeben. In eine zweite Mikrotiterplatte wurden 20 µl einer 4-fach konzentrierten Lösung der zu testenden Verbindungen vorgelegt. Beide Platten wurden gleichzeitig eine Stunde bei einer konstanten Temperatur von 28 °C im Epic Gerät gelagert. Anschließend wurde zunächst die Basis-Linie der Sensorplatte vermessen. Dann wurden je 10 µl der zu testenden Verbindungen durch die Injektionseinheit des Gerätes auf die Sensorplatte injiziert und die DMR für mindestens 3600 s aufgezeichnet.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

AB-MECA	4-Aminobenzyl-5'- <i>N</i> -methylcarboxamidoadenosin
AC	Adenylatcyclase
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
[Ar]	Argon-Atmosphäre
ARA	5'-Trifluormethoxy-(<i>N</i> ⁶ -(5-(trifluormethyl)-pyridin-2-yl)pyrrolidin-3-yl)adenosin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AV	atrioventrikulär

B

BAY68-4986	„Capadenoson“ 2-Amino-6-(2-(4-chlorphenyl)thiazol-4-ylthio)-4-(4-(2-hydroxyethoxy)phenyl)pyridin-3,5-dicarbonitril
BG-9719	1,3-Dipropyl-8-(2-(5,6-epoxy)norbornyl)xanthin
BG-9928	3-(((4-(1,3-Dipropyl)xanthin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]oktan-1-yl)propionsäure
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOC ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat
BS-DMPX	(<i>E</i>)-8-(3-Bromstyryl)-3,7-dimethyl-1-propinylxanthin

C

cAMP	3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CCKBR	Cholecystokinin B-Rezeptor
CCPA	2-Chloro- <i>N</i> ⁶ -cyclopentyladenosin
cDNA	„complementary DNA“ komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cGMP	3',5'-cyclisches Guanosinmonophosphat
CGS21680	2-[<i>p</i> -(2-Carboxyethyl)phenylethylamino]-5'- <i>N</i> -ethylcarboxamidoadenosin
CHA	<i>N</i> ⁶ -Cyclohexyladeonisin
CHO-Zellen	„Chinese hamster ovary cells“ Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
CPA	<i>N</i> ⁶ -Cyclopentyladenosin
CPFPX	8-Cyclopentyl-3-(3-fluorpropyl)-1-propylxanthin
CPX	1,3-Dipropyl-xanthine
CREB	„cAMP response element-binding protein“
CT	Computertomographie
CTX	Cholera toxin
CVT-2759	5'- <i>N</i> -Ethylcarboxamido- <i>N</i> ⁶ -(tetrahydrofuran-3-yl)adenosin
CVT-3619	5'-Deoxy-5'-(2-fluorphenylthio)- <i>N</i> ⁶ -((1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-hydroxy)cyclopentyladenosin
CysLT	Cysteinyl-Leukotrien

D

Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAG	1,2-Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DDT1 MF2-Zellen	isolierte, glatte Gefäßmuskelzellen des Vas deferens des Hamsters
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMPX	3,7-Dimethyl-1-propinylxanthin
DMR	„dynamic mass redistribution“ dynamischen Massen-Umverteilung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPCPX	8-Cyclo-pentyl-1,3-dipropyl-xanthin

E

EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDMA	Ethyl dimethylamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPDX	Ethyl-8-dicyclopropylmethyl-3-propylxanthin
ESI	Elektronensprayionisation
et al.	<i>et altera</i>
EtOAc	Ethylacetat

F

FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
FE@SUPPLY	2-Fluorethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinat
FET	O-(2-Fluoroethyl)-L-tyrosin
FK-453	(<i>R,E</i>)-1-(2-(Hydroxymethyl)piperidin-1-yl)-3-(2-phenylpyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on
FK-838	4-(6-Oxo-3-(2-phenylpyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyridin-3-yl)pyridazin-1(6 <i>H</i>)-yl)buttersäure
FMISO	Fluoromisonidazol
FR194921	2-(1-Methyl-4-piperidiny)-6-(2-phenylpyrazolo-[1,5- <i>α</i>]pyridin-3-yl)-3(2 <i>H</i>)-pyridazinon

G

GABA	γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
Glyme	Ethylenglycoldimethylether, 1,2-Dimethoxyethan
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPR17	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 17
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GR79236	N ⁶ -((1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-2-Hydroxy)cyclopentyladenosin
GRK	GPCR-spezifische Kinase
GSO	Gadoliniumoxyorthosilikate
GTP	Guanosintriphosphat

H

5-HT ₃	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 3
h	human
H (Aminosäure)	Histidin
HBSS	„Hank's balanced salt solution“
HEK293-Zellen	„human embryonic kidney cells“
	humane embryonische Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HSQC	„heteronuclear single quantum correlation“
	zweidimensionales heteronuclear korreliertes NMR-Spektrum

I, J

IB4	Isolectin B4
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IS-DMPX	(E)-8-(3-Iodstyryl)-3,7-dimethyl-1-propinylxanthin
Isoprop	Isopropanol = 2-Propanol
IUPAC	„International Union of Pure and Applied Chemistry“

K

KF15372	8-Dicyclopropylmethyl-1,3-dipropylxanthin
KF17837	7-Methyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropylxanthin
KF18446	siehe TMSX
KF19631	1,3-Diallyl-7-methyl-8-(3,4,5-trimethoxystyryl)xanthine
KF21213	1,3,7-Trimethyl-8-(2,3-dimethyl-4-methoxystyryl)xanthin
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
K _i	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
KW-3902	3-Noradamantyl-1,3-dipropylxanthin
KW-6002	1,3-Diethyl-7-methyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)xanthin

L

LC	„liquid chromatography“
	Flüssigkeitschromatographie
LH	luteinisierendes Hormon
Lit.	Literatur
LSO	Lutetiumoxyorthosilikate
LTC ₄	Leukotrien C ₄
	(5S,6R,7E,9E,11Z,14Z)-6-((R)-2-((S)-4-Amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)-5-hydroxyicosa-7,9,11,14-tetraensäure
LTD ₄	Leukotrien D ₄
	(5S,6R,7E,9E,11Z,14Z)-6-((R)-2-Amino-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)-5-hydroxyicosa-7,9,11,14-tetraensäure

M

m	„murine“ Mäuse-
MeOH	Methanol
MPDX	Methyl-8-dicyclopropylmethyl-3-propylxanthin
mRNA	„messenger-Ribonucleinsäure“, Boten-Ribonucleinsäure
MRS2179	2'-Desoxy- N^6 -methyl-adenosin-3',5'-diphosphat Tetra- natriumsalz
MS	Massenspektrometrie
MsCl	Mesylchlorid
MW	Mikrowelle

N

1321N1	humane Astrocytomzellen
n. d.	„not determined“ nicht bestimmt
NECA	5'- <i>N</i> -Ethylcarboxamidoadenosin
NIH	„National Institutes of Health“ in Bethesda, MD 20892, USA
NMR	„nuclear magnetic resonance“ Kernresonanz
NOS	Stickoxid-Synthase

O

OPC	„oligodendrocyt-precursor-cells“ Oligodendrozyt-Vorläufer-Zellen
ORF	„open reading frame“ offenes Leseraster

P, Q

PBS	„phosphate buffered saline“ phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTSA	<i>p</i> -Toluensulfonsäure
PTSM	Pyruvaldehyd-bis[N^4 -thiosemicarbazon]
PTX	Pertussistoxin

R

r	Ratten-
R (Aminosäure)	Arginin
RNA	Ribonucleinsäure
RP	„reversed phase“ Umkehrphase
R-PIA	N^6 -(2-Phenylisopropyl)adenosin

rpm	„rotations per minute“ Umdrehungen pro Minute
rt	Raumtemperatur
S	
SCH442416	5-Amino-7-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3- <i>e</i>]-1,2,4-triazolo[1,5- <i>c</i>]pyrimidin
SCH58261	7-(2-Phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3- <i>e</i>]-1,2,4-triazolo[1,5- <i>c</i>]pyrimidin
SEM	„Standard Error of the Mean“ Standardfehler
siRNAs	„small-interfering-RNAs“
SLV-320	<i>N</i> ⁶ -(4-Hydroxy)cyclohexyl-2-phenyladenin
Smp.	Schmelzpunkt
T	
TBABF	Tetrabutylammoniumdifluorid-Lösung (50 % in Acetonitril)
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat
TEA	Triethylamin
TEBA	Triethylbenzylammoniumchlorid
TFA	„Trifluoro acetic acid“ Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TM	transmembranäre Domäne
TMSX (= KF18446)	1,3,7-Trimethyl-8-(3,4,5-trimethoxystyryl)xanthin
TsCl	Tosylchlorid
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
U	
u. a.	und andere
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTR	3'-untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V, W	
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“ Gefäßendothel-Wachstumsfaktor
VLDL-Triglyceriden	„Very low density lipoprotein“
X, Y, Z	
X (Aminosäure)	beliebige Aminosäure
Zers.	Zersetzung
ZNS	Zentralnervensystem

8 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, **1998**.
- (2) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. 16. Auflage, Thieme Verlag: Stuttgart, **2006**.
- (3) Krauss, G. Biochemistry of signal transduction and regulation. Second Edition, Wiley-VCH: **2001**.
- (4) Hucho, F.; Weise, C. Ligandengesteuerte Ionenkanäle. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3194-3211.
- (5) Foreman, J. C.; Johansen, T.; Gibb, A. J. Textbook of Receptor Pharmacology. 3. Auflage, CRC Press: Boca Raton (USA), **2010**.
- (6) Kolakowski, L. F., Jr. GCRDb: A G protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, *2*, 1-7.
- (7) Tuteja, N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant. Signal. Behav.* **2009**, *4*, 942-947.
- (8) Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L. G.; Schioth, H. B. The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256-1272.
- (9) Schulte, G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class frizzled receptors. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 632-667.
- (10) Østerlund, T.; Kogerman, P. Hedgehog signalling: How to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 176-180.
- (11) Hepler, J. R.; Gilman, A. G. G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 383-387.
- (12) Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G proteins: A short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl. 1*, S46-55.
- (13) Riobo, N. A.; Manning, D. R. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G₁₂ family. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 146-154.
- (14) Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach.*; Straub, R. W.; Bolis, L.; (Eds.); Raven Press: New York, **1978**, 107-118.
- (15) Fredholm, B. B.; Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Daly, J. W.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A.; Leff, P.; Williams, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 143-156.
- (16) Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.
- (17) Londos, C.; Cooper, D. M.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 2551-2554.
- (18) van Calker, D.; Müller, M.; Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **1979**, *33*, 999-1005.
- (19) Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2B} receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 86-93.
- (20) Salvatore, C. A.; Jacobson, M. A.; Taylor, H. E.; Linden, J.; Johnson, R. G. Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 10365-10369.
- (21) Zhou, Q. Y.; Li, C.; Olah, M. E.; Johnson, R. A.; Stiles, G. L.; Civelli, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 7432-7436.

- (22) Fredholm, B. B.; Arslan, G.; Halldner, L.; Kull, B.; Schulte, G.; Wasserman, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 364-374.
- (23) Yan, L.; Burbiel, J. C.; Maass, A.; Müller, C. E. Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. *Expert Opin. Emerging Drugs* **2003**, *8*, 537-576.
- (24) Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **1985**, *16*, 433-440.
- (25) Burnstock, G. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 793-803.
- (26) Li, M.; Kawate, T.; Silberberg, S. D.; Swartz, K. J. Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 44.
- (27) Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 107-118.
- (28) Evans, R. J.; Lewis, C.; Virginio, C.; Lundstrom, K.; Buell, G.; Surprenant, A.; North, R. A. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J. Physiol.* **1996**, *497* (Pt 2), 413-422.
- (29) Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1471-1483.
- (30) Jacobson, K. A.; Boeynaems, J. M. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 570-578.
- (31) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281-341.
- (32) von Kügelgen, I.; Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 310-323.
- (33) Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8573-8578.
- (34) Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kügelgen, I.; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955-964.
- (35) Brunschweiler, A.; Müller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides - an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
- (36) Tucker, A. L.; Robeva, A. S.; Taylor, H. E.; Holeton, D.; Bockner, M.; Lynch, K. R.; Linden, J. A₁ adenosine receptors. two amino acids are responsible for species differences in ligand recognition. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27900-27906.
- (37) Schiemann, W. P.; Doggwiler, K. O.; Buxton, I. L. Action of adenosine in estrogen-primed nonpregnant guinea pig myometrium: characterization of the smooth muscle receptor and coupling to phosphoinositide metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *258*, 429-437.
- (38) Schiemann, W. P.; Westfall, D. P.; Buxton, I. L. Smooth muscle adenosine A₁ receptors couple to disparate effectors by distinct G proteins in pregnant myometrium. *Am. J. Physiol.* **1991**, *261*, E141-150.
- (39) Weinberg, J. M.; Davis, J. A.; Shayman, J. A.; Knight, P. R. Alterations of cytosolic calcium in LLC-PK1 cells induced by vasopressin and exogenous purines. *Am. J. Physiol.* **1989**, *256*, C967-976.

- (40) Kurachi, Y.; Nakajima, T.; Sugimoto, T. On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **1986**, *407*, 264-274.
- (41) Belardinelli, L.; Shryock, J. C.; Song, Y.; Wang, D.; Srinivas, M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* **1995**, *9*, 359-365.
- (42) Kirsch, G. E.; Codina, J.; Birnbaumer, L.; Brown, A. M. Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **1990**, *259*, H820-826.
- (43) Dolphin, A. C.; Forda, S. R.; Scott, R. H. Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J. Physiol.* **1986**, *373*, 47-61.
- (44) Umemiya, M.; Berger, A. J. Activation of adenosine A₁ and A₂ receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron* **1994**, *13*, 1439-1446.
- (45) Bünemann, M.; Hosey, M. M. G protein-coupled receptor kinases as modulators of G protein signalling. *J. Physiol.* **1999**, *517* (Pt 1), 5-23.
- (46) Palmer, T. M.; Benovic, J. L.; Stiles, G. L. Molecular basis for subtype-specific desensitization of inhibitory adenosine receptors. Analysis of a chimeric A₁-A₃ adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15272-15278.
- (47) Murray, T. F. Up-regulation of rat cortical adenosine receptors following chronic administration of theophylline. *Eur. J. Pharmacol.* **1982**, *82*, 113-114.
- (48) Ramkumar, V.; Olah, M. E.; Jacobson, K. A.; Stiles, G. L. Distinct pathways of desensitization of A₁- and A₂-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 639-647.
- (49) Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1290-1308.
- (50) Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; Lohse, M. J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 1-9.
- (51) Knutsen, L. J. S.; Lau, J.; Sheardown, M. J. The synthesis and biochemical evaluation of new A₁ selective adenosine receptor agonists containing 6-hydrazino purine moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2661-2666.
- (52) Vittori, S.; Lorenzen, A.; Stanek, C.; Costanzi, S.; Volpini, R.; Ijzerman, A. P.; Kunzel, J. K.; Cristalli, G. N-Cycloalkyl derivatives of adenosine and 1-deazaadenosine as agonists and partial agonists of the A₁ adenosine receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 250-260.
- (53) Franchetti, P.; Cappellacci, L.; Marchetti, S.; Trincavelli, L.; Martini, C.; Mazzoni, M. R.; Lucacchini, A.; Grifantini, M. 2'-C-Methyl analogues of selective adenosine receptor agonists: synthesis and binding studies. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1708-1715.
- (54) Müller, C. E. Adenosine receptor ligands - recent developments part I. Agonists. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.
- (55) Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
- (56) Müller, C. E.; Stein, B. Adenosine receptor antagonists: structures and potential therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* **1996**, *2*, 501-530.
- (57) Müller, C. E. A₁ adenosine receptors and their ligands: overview and recent developments. *Farmaco* **2001**, *56*, 77-80.
- (58) Shimada, J.; Suzuki, F.; Nonaka, H.; Ishii, A.; Ichikawa, S. (E)-1,3-Dialkyl-7-methyl-8-(3,4,5-trimethoxystyryl)xanthines: potent and selective adenosine A₂ antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2342-2345.
- (59) Shimada, J.; Suzuki, F.; Nonaka, H.; Karasawa, A.; Mizumoto, H.; Ohno, T.; Kubo, K.; Ishii, A. 8-(Dicyclopropylmethyl)-1,3-dipropylxanthine: a potent and selective adeno-

- sine A₁ antagonist with renal protective and diuretic activities. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 466-469.
- (60) Müller, C. E.; Shi, D.; Manning, M., Jr.; Daly, J. W. Synthesis of paraxanthine analogs (1,7-disubstituted xanthines) and other xanthines unsubstituted at the 3-position: structure-activity relationships at adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3341-3349.
- (61) Daly, J. W.; Hide, I.; Müller, C. E.; Shamim, M. Caffeine analogs: structure-activity relationships at adenosine receptors. *Pharmacology* **1991**, *42*, 309-321.
- (62) Müller, C. E. Formation of oxazolo[3,2-*a*]purinones from propynyluracils. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1928-1929.
- (63) Grahner, B.; Winiwarter, S.; Lanzner, W.; Müller, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of deazaxanthines: analogs of potent A₁- and A₂-adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1526-1534.
- (64) Suzuki, F.; Shimada, J.; Shiozaki, S.; Ichikawa, S.; Ishii, A.; Nakamura, J.; Nonaka, H.; Kobayashi, H.; Fuse, E. Adenosine A₁ antagonists. III. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine- or N⁶-(*R*)-phenylisopropyladenosine-induced cognitive disturbance. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2508-2518.
- (65) Bruns, R. F.; Fergus, J. H.; Badger, E. W.; Bristol, J. A.; Santay, L. A.; Hartman, J. D.; Hays, S. J.; Huang, C. C. Binding of the A₁-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1987**, *335*, 59-63.
- (66) Vu, C. B.; Kiesman, W. F.; Conlon, P. R.; Lin, K. C.; Tam, M.; Petter, R. C.; Smits, G.; Lutterodt, F.; Jin, X.; Chen, L.; Zhang, J. Tricyclic imidazoline derivatives as potent and selective adenosine A₁ receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7132-7139.
- (67) Chang, L. C.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. Non-xanthine antagonists for the adenosine A₁ receptor. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1591-1626.
- (68) Klotz, K. N. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 382-391.
- (69) Hess, S. Recent advances in adenosine receptor antagonist research. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2001**, *11*, 1533-1561.
- (70) Erfurth, A.; Schmauss, M. Perspektiven zur Therapie neuropsychiatrischer Erkrankungen mit adenosinergen Substanzen. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* **1995**, *63*, 93-98.
- (71) Sebastiao, A. M.; Ribeiro, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 471-534.
- (72) Porkka-Heiskanen, T.; Alanko, L.; Kalinchuk, A.; Stenberg, D. Adenosine and sleep. *Sleep Med. Rev.* **2002**, *6*, 321-332.
- (73) Stone, T. W.; Collis, M. G.; Williams, M.; Miller, L. P.; Karasawa, A.; Hillaire-Buys, D. Adenosine: some therapeutic applications and prospects. In *Pharmacological sciences: perspectives for research and therapy in the late 1990s.*; Cuello, A. C.; Collier, B.; (Eds.); Birkhäuser: Basel, **1995**, 303-309.
- (74) Florio, C.; Prezioso, A.; Papaioannou, A.; Vertua, R. Adenosine A₁ receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology* **1998**, *136*, 311-319.
- (75) Prediger, R. D.; da Silva, G. E.; Batista, L. C.; Bittencourt, A. L.; Takahashi, R. N. Activation of adenosine A₁ receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. *Neuropsychopharmacol.* **2006**, *31*, 2210-2220.
- (76) Pelleg, A.; Hurt, C.; Miyagawa, A.; Michelson, E. L.; Dreifus, L. S. Differential sensitivity of cardiac pacemakers to exogenous adenosine in vivo. *Am. J. Physiol.* **1990**, *258*, H1815-1822.
- (77) Koglin, J.; Stäblein, A.; von Scheidt, W. Supersensitivity mismatch of adenosine in the transplanted human heart: chrono- and dromotropy versus inotropy. *Transpl. Int.* **1996**, *9*, 9-14.
- (78) Cohen, M. V.; Downey, J. M. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **2008**, *103*, 203-215.
- (79) Allegrucci, C.; Liguori, L.; Mezzasoma, I.; Minelli, A. A₁ adenosine receptor in human spermatozoa: its role in the fertilization process. *Mol. Gen. Metab.* **2000**, *71*, 381-386.

-
- (80) Cushley, M. J.; Tattersfield, A. E.; Holgate, S. T. Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1983**, *15*, 161-165.
- (81) Wilson, C. N.; Nadeem, A.; Spina, D.; Brown, R.; Page, C. P.; Mustafa, S. J. Adenosine receptors and asthma. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 329-362.
- (82) Cohn, L.; Elias, J. A.; Chupp, G. L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* **2004**, *22*, 789-815.
- (83) Johnson, H. G.; McNee, M. L. Adenosine-induced secretion in the canine trachea: modification by methylxanthines and adenosine derivatives. *Br. J. Pharmacol.* **1985**, *86*, 63-67.
- (84) McNamara, N.; Gallup, M.; Khong, A.; Sucher, A.; Maltseva, I.; Fahy, J.; Basbaum, C. Adenosine up-regulation of the mucin gene, MUC2, in asthma. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1770-1772.
- (85) Cronstein, B. N.; Daguma, L.; Nichols, D.; Hutchison, A. J.; Williams, M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A₁ and A₂ receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 1150-1157.
- (86) Cronstein, B. N.; Levin, R. I.; Philips, M.; Hirschhorn, R.; Abramson, S. B.; Weissmann, G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A₁ receptors and inhibited via adenosine A₂ receptors. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2201-2206.
- (87) Salmon, J. E.; Brogle, N.; Brownlie, C.; Edberg, J. C.; Kimberly, R. P.; Chen, B. X.; Erlanger, B. F. Human mononuclear phagocytes express adenosine A₁ receptors. A novel mechanism for differential regulation of Fcγ receptor function. *J. Immunol.* **1993**, *151*, 2775-2785.
- (88) Panther, E.; Idzko, M.; Herouy, Y.; Rheinen, H.; Gebicke-Haerter, P. J.; Mrowietz, U.; Dichmann, S.; Norgauer, J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1963-1970.
- (89) Clark, A. N.; Youkey, R.; Liu, X.; Jia, L.; Blatt, R.; Day, Y. J.; Sullivan, G. W.; Linden, J.; Tucker, A. L. A₁ adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ. Res.* **2007**, *101*, 1130-1138.
- (90) Ryzhov, S.; Solenkova, N. V.; Goldstein, A. E.; Lamparter, M.; Fleenor, T.; Young, P. P.; Greelish, J. P.; Byrne, J. G.; Vaughan, D. E.; Biaggioni, I.; Hatzopoulos, A. K.; Feoktistov, I. Adenosine receptor-mediated adhesion of endothelial progenitors to cardiac microvascular endothelial cells. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 356-363.
- (91) Synowitz, M.; Glass, R.; Farber, K.; Markovic, D.; Kronenberg, G.; Herrmann, K.; Schnermann, J.; Nolte, C.; van Rooijen, N.; Kiwit, J.; Kettenmann, H. A₁ adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8550-8557.
- (92) Edlund, A.; Sollevi, A. Renal effects of i.v. adenosine infusion in humans. *Clin. Physiol.* **1993**, *13*, 361-371.
- (93) Vallon, V.; Osswald, H. Adenosine receptors and the kidney. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 443-470.
- (94) Jackson, E. K.; Raghvendra, D. K. The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **2004**, *66*, 571-599.
- (95) Cai, H.; Batuman, V.; Puschett, D. B.; Puschett, J. B. Effect of KW-3902, a novel adenosine A₁ receptor antagonist, on sodium-dependent phosphate and glucose transport by the rat renal proximal tubular cell. *Life Sci.* **1994**, *55*, 839-845.
- (96) Takeda, M.; Yoshitomi, K.; Imai, M. Regulation of Na⁺-3HCO₃⁻ cotransport in rabbit proximal convoluted tubule via adenosine A₁ receptor. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, F511-519.
- (97) Tang, Y.; Zhou, L. Characterization of adenosine A₁ receptors in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *Receptor. Channel.* **2003**, *9*, 67-75.

- (98) Yagil, C.; Katni, G.; Yagil, Y. The effects of adenosine on transepithelial resistance and sodium uptake in the inner medullary collecting duct. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **1994**, *427*, 225-232.
- (99) Fain, J. N.; Pointer, R. H.; Ward, W. F. Effects of adenosine nucleosides on adenylate cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine monophosphate accumulation, and lipolysis in fat cells. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6866-6872.
- (100) Dhalla, A. K.; Chisholm, J. W.; Reaven, G. M.; Belardinelli, L. A₁ adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 271-295.
- (101) Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1-34.
- (102) Kiesman, W. F.; Elzein, E.; Zablocki, J. A₁ adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 25-58.
- (103) Ellenbogen, K. A.; O'Neill, G.; Prystowsky, E. N.; Camm, J. A.; Meng, L.; Lieu, H. D.; Jerling, M.; Shreenivas, R.; Belardinelli, L.; Wolff, A. A. Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson. *Circulation* **2005**, *111*, 3202-3208.
- (104) NCT00040001. Safety and efficacy study of an A₁-adenosine receptor agonist to slow heart rate in atrial fibrillation. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00040001>.
- (105) Song, Y.; Wu, L.; Shryock, J. C.; Belardinelli, L. Selective attenuation of isoproterenol-stimulated arrhythmic activity by a partial agonist of adenosine A₁ receptor. *Circulation* **2002**, *105*, 118-123.
- (106) Wu, L.; Belardinelli, L.; Zablocki, J. A.; Palle, V.; Shryock, J. C. A partial agonist of the A₁-adenosine receptor selectively slows AV conduction in guinea pig hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**, *280*, H334-343.
- (107) Zablocki, J. A.; Wu, L.; Shryock, J.; Belardinelli, L. Partial A₁ adenosine receptor agonists from a molecular perspective and their potential use as chronic ventricular rate control agents during atrial fibrillation (AF). *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 839-854.
- (108) Qu, X.; Cooney, G.; Donnelly, R. Short-term metabolic and haemodynamic effects of GR79236 in normal and fructose-fed rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *338*, 269-276.
- (109) Bigot, A.; Stengelin, S.; Jaehne, G.; Herling, A.; Müller, G.; Hock, F. J.; Myers, M. R. N⁶-Substituted adenosine analogues and their use as pharmaceutical agents. Eur. Pat. Appl. EP1375508A1, **2004**.
- (110) Dhalla, A. K.; Wong, M. Y.; Voshol, P. J.; Belardinelli, L.; Reaven, G. M. A₁ Adenosine Receptor Partial Agonist Lowers Plasma FFA and Improves Insulin Resistance Induced by High-Fat Diet in Rodents. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *292*, E1358-1363.
- (111) Gao, Z. G.; Jacobson, K. A. Emerging adenosine receptor agonists. *Expert Opin. Emerging Drugs* **2007**, *12*, 479-492.
- (112) NCT00376454 The study of GW493838, an adenosine A₁ agonist, in peripheral neuropathic pain. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00376454>.
- (113) NCT00568945 Study to investigate the effect of the A₁ agonist capadenoson on ventricular HR in patients with persistent or permanent atrial fibrillation. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00568945>.
- (114) Bayer HealthCare Trial Finder. https://www.bayerpharma.com/de/forschung-und-entwicklung/klinische-studien/datenbank/index.php?search=Capadenoson&btnSubmit=submit&product=&overall_status=&country=&phase=&condition=&results=0&trials=1&num=10&show=1 (aufgerufen am 21. März 2012).
- (115) Cotter, G.; Dittrich, H. C.; Davison Weatherley, B.; Bloomfield, D. M.; O'Connor, C. M.; Metra, M.; Massie, B. M. The PROTECT Pilot Study: A randomized, placebo-controlled, dose-finding study of the adenosine A₁ receptor antagonist rolofylline in patients with acute heart failure and renal impairment. *J. Card. Fail.* **2008**, *14*, 631-640.

- (116) Cleland, J. G. F.; Coletta, A. P.; Yassin, A.; Buga, L.; Torabi, A.; Clark, A. L. Clinical trials update from the European Society of Cardiology Meeting 2009: AAA, RELY, PROTECT, ACTIVE-I, European CRT survey, German pre-SCD II registry, and MADIT-CRT. *Eur. J. Heart Fail.* **2009**, *11*, 1214-1219.
- (117) Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 238-263.
- (118) Giorgi, I.; Nieri, P. Therapeutic potential of A₁ adenosine receptor ligands: a survey of recent patent literature. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2008**, *18*, 677-691.
- (119) Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P.; Ballew, R. M.; Huson, D. H.; Wortman, J. R.; Zhang, Q.; Kodira, C. D.; Zheng, X. H.; Chen, L.; Skupski, M.; Subramanian, G.; Thomas, P. D.; Zhang, J.; Gabor Miklos, G. L.; Nelson, C.; Broder, S.; Clark, A. G.; Nadeau, J.; McKusick, V. A.; Zinder, N.; Levine, A. J.; Roberts, R. J.; Simon, M.; Slayman, C.; Hunkapiller, M.; Bolanos, R.; Delcher, A.; Dew, I.; Fasulo, D.; Flanigan, M.; Florea, L.; Halpern, A.; Hannenhalli, S.; Kravitz, S.; Levy, S.; Mobarry, C.; Reinert, K.; Remington, K.; Abu-Threideh, J.; Beasley, E.; Biddick, K.; Bonazzi, V.; Brandon, R.; Cargill, M.; Chandramouliswaran, I.; Charlab, R.; Chaturvedi, K.; Deng, Z.; Di Francesco, V.; Dunn, P.; Eilbeck, K.; Evangelista, C.; Gabrielian, A. E.; Gan, W.; Ge, W.; Gong, F.; Gu, Z.; Guan, P.; Heiman, T. J.; Higgins, M. E.; Ji, R. R.; Ke, Z.; Ketchum, K. A.; Lai, Z.; Lei, Y.; Li, Z.; Li, J.; Liang, Y.; Lin, X.; Lu, F.; Merkulov, G. V.; Milshina, N.; Moore, H. M.; Naik, A. K.; Narayan, V. A.; Neelam, B.; Nusskern, D.; Rusch, D. B.; Salzberg, S.; Shao, W.; Shue, B.; Sun, J.; Wang, Z.; Wang, A.; Wang, X.; Wang, J.; Wei, M.; Wides, R.; Xiao, C.; Yan, C.; Yao, A.; Ye, J.; Zhan, M.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zhong, F.; Zhong, W.; Zhu, S.; Zhao, S.; Gilbert, D.; Baumhueter, S.; Spier, G.; Carter, C.; Cravchik, A.; Woodage, T.; Ali, F.; An, H.; Awe, A.; Baldwin, D.; Baden, H.; Barnstead, M.; Barrow, I.; Beeson, K.; Busam, D.; Carver, A.; Center, A.; Cheng, M. L.; Curry, L.; Danaher, S.; Davenport, L.; Desilets, R.; Dietz, S.; Dodson, K.; Doup, L.; Ferriera, S.; Garg, N.; Gluecksmann, A.; Hart, B.; Haynes, J.; Haynes, C.; Heiner, C.; Hladun, S.; Hostin, D.; Houck, J.; Howland, T.; Ibegwam, C.; Johnson, J.; Kalush, F.; Kline, L.; Koduru, S.; Love, A.; Mann, F.; May, D.; McCawley, S.; McIntosh, T.; McMullen, I.; Moy, M.; Moy, L.; Murphy, B.; Nelson, K.; Pfannkoch, C.; Pratts, E.; Puri, V.; Qureshi, H.; Reardon, M.; Rodriguez, R.; Rogers, Y. H.; Romblad, D.; Ruhfel, B.; Scott, R.; Sitter, C.; Smallwood, M.; Stewart, E.; Strong, R.; Suh, E.; Thomas, R.; Tint, N. N.; Tse, S.; Vech, C.; Wang, G.; Wetter, J.; Williams, S.; Williams, M.; Windsor, S.; Winn-Deen, E.; Wolfe, K.; Zaveri, J.; Zaveri, K.; Abril, J. F.; Guigo, R.; Campbell, M. J.; Sjolander, K. V.; Karlak, B.; Kejariwal, A.; Mi, H.; Lazareva, B.; Hatton, T.; Narechania, A.; Diemer, K.; Muruganujan, A.; Guo, N.; Sato, S.; Bafna, V.; Istrail, S.; Lippert, R.; Schwartz, R.; Walenz, B.; Yooseph, S.; Allen, D.; Basu, A.; Baxendale, J.; Blick, L.; Caminha, M.; Carnes-Stine, J.; Caulk, P.; Chiang, Y. H.; Coyne, M.; Dahlke, C.; Mays, A.; Dombroski, M.; Donnelly, M.; Ely, D.; Esparham, S.; Fosler, C.; Gire, H.; Glanowski, S.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gorokhov, M.; Graham, K.; Gropman, B.; Harris, M.; Heil, J.; Henderson, S.; Hoover, J.; Jennings, D.; Jordan, C.; Jordan, J.; Kasha, J.; Kagan, L.; Kraft, C.; Levitsky, A.; Lewis, M.; Liu, X.; Lopez, J.; Ma, D.; Majoros, W.; McDaniel, J.; Murphy, S.; Newman, M.; Nguyen, T.; Nguyen, N.; Nodell, M.; Pan, S.; Peck, J.; Peterson, M.; Rowe, W.; Sanders, R.; Scott, J.; Simpson, M.; Smith, T.; Sprague, A.; Stockwell, T.; Turner, R.; Venter, E.; Wang, M.; Wen, M.; Wu, D.; Wu, M.; Xia, A.; Zandieh, A.; Zhu, X. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- (120) Lappano, R.; Maggiolini, M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 47-60.
- (121) Hu, L. A.; Tang, P. M.; Eslahi, N. K.; Zhou, T.; Barbosa, J.; Liu, Q. Identification of surrogate agonists and antagonists for orphan G protein-coupled receptor GPR139. *J. Biomol. Screen* **2009**, *14*, 789-797.

- (122) Stadel, J. M.; Wilson, S.; Bergsma, D. J. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 430-437.
- (123) Howard, A. D.; McAllister, G.; Feighner, S. D.; Liu, Q.; Nargund, R. P.; Van der Ploeg, L. H.; Patchett, A. A. Orphan G Protein-Coupled Receptors and Natural Ligand Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 132-140.
- (124) Raport, C. J.; Schweickart, V. L.; Chantry, D.; Eddy, R. L., Jr.; Shows, T. B.; Godiska, R.; Gray, P. W. New members of the chemokine receptor gene family. *J. Leukocyte Biol.* **1996**, *59*, 18-23.
- (125) Bläsius, R.; Weber, R. G.; Lichter, P.; Ogilvie, A. A novel orphan G protein-coupled receptor primarily expressed in the brain is localized on human chromosomal band 2q21. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1357-1365.
- (126) Pugliese, A. M.; Trincavelli, M. L.; Lecca, D.; Coppi, E.; Fumagalli, M.; Ferrario, S.; Failli, P.; Daniele, S.; Martini, C.; Pedata, F.; Abbracchio, M. P. Functional characterization of two isoforms of the P2Y-like receptor GPR17: [³⁵S]GTPγS binding and electrophysiological studies in 1321N1 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2009**, *297*, C1028-1040.
- (127) Benned-Jensen, T.; Rosenkilde, M. M. Distinct expression and ligand-binding profiles of two constitutively active GPR17 splice variants. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 1092-1105.
- (128) Ciana, P.; Fumagalli, M.; Trincavelli, M. L.; Verderio, C.; Rosa, P.; Lecca, D.; Ferrario, S.; Parravicini, C.; Capra, V.; Gelosa, P.; Guerrini, U.; Belcredito, S.; Cimino, M.; Sironi, L.; Tremoli, E.; Rovati, G. E.; Martini, C.; Abbracchio, M. P. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4615-4627.
- (129) Gloriam, D. E.; Fredriksson, R.; Schioth, H. B. The G Protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* **2007**, *8*, 338-354.
- (130) Abbracchio, M. P.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Miras-Portugal, M. T.; King, B. F.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A.; Burnstock, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 52-55.
- (131) Parravicini, C.; Ranghino, G.; Abbracchio, M. P.; Fantucci, P. GPR17: molecular modeling and dynamics studies of the 3-D structure and purinergic ligand binding features in comparison with P2Y receptors. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 263.
- (132) Wittenberger, T.; Hellebrand, S.; Munck, A.; Kreienkamp, H. J.; Schaller, H. C.; Hampe, W. GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors. *BMC Genomics* **2002**, *3*, 17.
- (133) Ingall, A. H.; Dixon, J.; Bailey, A.; Coombs, M. E.; Cox, D.; McNally, J. I.; Hunt, S. F.; Kindon, N. D.; Teobald, B. J.; Willis, P. A.; Humphries, R. G.; Leff, P.; Clegg, J. A.; Smith, J. A.; Tomlinson, W. Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 213-220.
- (134) Marteau, F.; Le Poul, E.; Communi, D.; Communi, D.; Labouret, C.; Savi, P.; Boeynaems, J. M.; Gonzalez, N. S. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 104-112.
- (135) Jacobson, K. A.; Jarvis, M. F.; Williams, M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4057-4093.
- (136) Brink, C.; Dahlen, S. E.; Drazen, J.; Evans, J. F.; Hay, D. W.; Nicosia, S.; Serhan, C. N.; Shimizu, T.; Yokomizo, T. International Union of Pharmacology. XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 195-227.
- (137) Capra, V.; Thompson, M. D.; Sala, A.; Cole, D. E.; Folco, G.; Rovati, G. E. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 469-527.
- (138) Calleri, E.; Ceruti, S.; Cristalli, G.; Martini, C.; Temporini, C.; Parravicini, C.; Volpini, R.; Daniele, S.; Caccialanza, G.; Lecca, D.; Lambertucci, C.; Trincavelli, M. L.; Marucci, G.; Wainer, I. W.; Ranghino, G.; Fantucci, P.; Abbracchio, M. P.; Massolini,

- G. Frontal affinity chromatography-mass spectrometry useful for characterization of new ligands for GPR17 receptor. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3489-3501.
- (139) Parravicini, C.; Abbracchio, M. P.; Fantucci, P.; Ranghino, G. Forced unbinding of GPR17 ligands from wild type and R255I mutant receptor models through a computational approach. *BMC Struct. Biol.* **2010**, 10, 8.
- (140) Qi, A.-D.; Harden, T. K.; Nicholas, R. A. Poster: Evaluation of nucleotides, nucleotide sugars, and lipid mediators as agonists of GPR17 and GPR87, At *Purines 2008*, Copenhagen, Dänemark.
- (141) Maekawa, A.; Balestrieri, B.; Austen, K. F.; Kanaoka, Y. GPR17 is a negative regulator of the cysteinyl leukotriene 1 receptor response to leukotriene D₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 11685-11690.
- (142) Kilpatrick, G. J.; Dautzenberg, F. M.; Martin, G. R.; Eglen, R. M. 7TM receptors: the splicing on the cake. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20, 294-301.
- (143) Miyake, A. A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 208, 230-237.
- (144) Spinrath, A. Development of pharmacological modulators for the orphan G protein-coupled receptor GPR17 and their application for the investigation of molecular signal transduction pathways. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. **2011**.
- (145) Aalto, Y.; El-Rifa, W.; Vilpo, L.; Ollila, J.; Nagy, B.; Vihinen, M.; Vilpo, J.; Knuutila, S. Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 Deletion. *Leukemia* **2001**, 15, 1721-1728.
- (146) Lecca, D.; Gelosa, P.; Fumagalli, M.; Buffo, A.; Sironi, L.; Rosa, P.; Verderio, C. The receptor GPR17: a sensor of brain damage and a new target for brain repair. http://www.lsw.ni.it/en/biology/news/the_receptor_gpr17_a_sensor_of_brain_damage_and_a_new_target_for_brain_repair (05.02.2009).
- (147) Maisel, M.; Herr, A.; Milosevic, J.; Hermann, A.; Habisch, H. J.; Schwarz, S.; Kirsch, M.; Antoniadis, G.; Brenner, R.; Hallmeyer-Elgner, S.; Lerche, H.; Schwarz, J.; Storch, A. Transcription profiling of adult and fetal human neuroprogenitors identifies divergent paths to maintain the neuroprogenitor cell state. *Stem Cells* **2007**, 25, 1231-1240.
- (148) Lecca, D.; Trincavelli, M. L.; Gelosa, P.; Sironi, L.; Ciana, P.; Fumagalli, M.; Villa, G.; Verderio, C.; Grumelli, C.; Guerrini, U.; Tremoli, E.; Rosa, P.; Cuboni, S.; Martini, C.; Buffo, A.; Cimino, M.; Abbracchio, M. P. The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PLoS One* **2008**, 3, e3579.
- (149) Ceruti, S.; Villa, G.; Genovese, T.; Mazzon, E.; Longhi, R.; Rosa, P.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S.; Abbracchio, M. P. The P2Y-like receptor GPR17 as a sensor of damage and a new potential target in spinal cord injury. *Brain* **2009**, 132, 2206-2218.
- (150) Chen, Y.; Wu, H.; Wang, S.; Koito, H.; Li, J.; Ye, F.; Hoang, J.; Escobar, S. S.; Gow, A.; Arnett, H. A.; Trapp, B. D.; Karandikar, N. J.; Hsieh, J.; Lu, Q. R. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat. Neurosci.* **2009**, 12, 1398-1406.
- (151) Daniele, S.; Lecca, D.; Trincavelli, M. L.; Ciampi, O.; Abbracchio, M. P.; Martini, C. Regulation of PC12 cell survival and differentiation by the new P2Y-like receptor GPR17. *Cell. Signal.* **2010**, 22, 697-706.
- (152) Maekawa, A.; Xing, W.; Austen, K. F.; Kanaoka, Y. GPR17 regulates immune pulmonary inflammation induced by house dust mites. *J. Immunol.* **2010**, 185, 1846-1854.
- (153) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. Molecular imaging with PET. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1501-1516.
- (154) Schwaiger, M.; Pirich, C. Positron emission tomography. *Z. Kardiol.* **2000**, 89 Suppl 1, 59-66.
- (155) Martínez, M.-J.; Ziegler, S. I.; Beyer, T. PET and PET/CT: basic principles and instrumentation. In *PET in Oncology*; Dresel, S.; (Ed.); **2008**, 1-23.

- (156) Herzog, H.; Rösch, F. PET- und SPECT-Technik: Chemie und Physik der Bildgebung. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 468-473.
- (157) Max-Planck-Gesellschaft Positronen-Emissions-Tomographie (PET) - Ein minimal-invasives nuklearmedizinisches Verfahren. <http://www.nf.mpg.de/index.php?id=78> (24.04.2012).
- (158) Qaim, S. M.; Coenen, H. H. Produktion pharmazeutisch relevanter Radionuklide: An Reaktoren und Zyklotronen. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 460-466.
- (159) Guhlke, S.; Verbruggen, A. M.; Vallabhajosula, S. Radiochemistry and radiopharmacy. In *Clinical Nuclear Medicine*; Biersack, H.-J.; Freeman, L.; (Eds.); Springer: Berlin & Heidelberg, **2007**, 34-76.
- (160) Mohnike, W.; Hör, G.; Schelbert, H. PET/CT-Atlas: Interdisziplinäre onkologische, neurologische und kardiologische PET/CT-Diagnostik. 2. Auflage, Springer: Berlin & Heidelberg, **2011**.
- (161) Rösch, F.; Gründer, G.; Schreckenberger, M.; Dannhardt, G. Diagnostik von ZNS-Erkrankungen mittels PET bzw. SPECT: Radiopharmazeutische Strategien und klinische Anwendungen. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 474-482.
- (162) Brüning, R.; Küttner, A.; Flohr, T.; Herzog, P.; Schmid, R. A. Indikationen für die PET-CT. In *Mehrschicht-CT*; Springer: Berlin & Heidelberg, **2008**, 201-211.
- (163) Holschbach, M. H.; Olsson, R. A.; Bier, D.; Wutz, W.; Sihver, W.; Schüller, M.; Palm, B.; Coenen, H. H. Synthesis and Evaluation of No-Carrier-Added 8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸F]fluoropropyl)-1-propylxanthine ([¹⁸F]CPFPX): A Potent and Selective A₁-Adenosine Receptor Antagonist for *in Vivo* Imaging. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5150-5156.
- (164) Suzuki, F.; Shimada, J.; Mizumoto, H.; Karasawa, A.; Kubo, K.; Nonaka, H.; Ishii, A.; Kawakita, T. Adenosine A₁ antagonists. II. Structure-activity relationships on diuretic activities and protective effects against acute renal failure. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3066-3075.
- (165) Shimada, J.; Suzuki, F.; Nonaka, H.; Ishii, A. 8-Polycycloalkyl-1,3-dipropylxanthines as potent and selective antagonists for A₁-adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 924-930.
- (166) Bulicz, J.; Bertarelli, D. C. G.; Baumert, D.; Fülle, F.; Müller, C. E.; Heber, D. Synthesis and pharmacology of pyrido[2,3-d]pyrimidinediones bearing polar substituents as adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2837-2849.
- (167) Holschbach, M. H.; Fein, T.; Krummeich, C.; Lewis, R. G.; Wutz, W.; Schwabe, U.; Unterlugauer, D.; Olsson, R. A. A₁ adenosine receptor antagonists as ligands for positron emission tomography (PET) and single-photon emission tomography (SPET). *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 555-563.
- (168) Noguchi, J.; Ishiwata, K.; Furuta, R.; Simada, J.; Kiyosawa, M.; Ishii, S.; Endo, K.; Suzuki, F.; Senda, M. Evaluation of carbon-11 labeled KF15372 and its ethyl and methyl derivatives as a potential CNS adenosine A₁ receptor ligand. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 53-59.
- (169) Matsuya, T.; Takamatsu, H.; Murakami, Y.; Noda, A.; Ichise, R.; Awaga, Y.; Nishimura, S. Synthesis and evaluation of [¹¹C]FR194921 as a nonxanthine-type PET tracer for adenosine A₁ receptors in the brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 837-844.
- (170) Maemoto, T.; Tada, M.; Mihara, T.; Ueyama, N.; Matsuoka, H.; Harada, K.; Yamaji, T.; Shirakawa, K.; Kuroda, S.; Akahane, A.; Iwashita, A.; Matsuoka, N.; Mutoh, S. Pharmacological characterization of FR194921, a new potent, selective, and orally active antagonist for central adenosine A₁ receptors. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 42-52.
- (171) Akahane, A.; Kuroda, S.; Itani, H.; Shimizu, Y. Preparation of pyrazolopyridine compounds as adenosine antagonists. PCT Int. Appl. WO9803507A1, **1998**.
- (172) Kuroda, S.; Takamura, F.; Tenda, Y.; Itani, H.; Tomishima, Y.; Akahane, A.; Sakane, K. Design, synthesis and biological evaluation of a novel series of potent, orally active adenosine A₁ receptor antagonists with high blood-brain-barrier permeability. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 988-998.

- (173) Wilson, C. N.; Mustafa, S. J.; Bauer, A.; Ishiwata, K. Adenosine receptor ligands and PET imaging of the CNS. In *Adenosine Receptors in Health and Disease*; Springer: Berlin & Heidelberg, **2009**, 193, 617-642.
- (174) Müller, C. E.; Geis, U.; Hipp, J.; Schobert, U.; Frobenius, W.; Pawlowski, M.; Suzuki, F.; Sandoval-Ramirez, J. Synthesis and structure-activity relationships of 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine derivatives, A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4396-4405.
- (175) Yang, M.; Soohoo, D.; Soelaiman, S.; Kalla, R.; Zablocki, J.; Chu, N.; Leung, K.; Yao, L.; Diamond, I.; Belardinelli, L.; Shryock, J. Characterization of the potency, selectivity, and pharmacokinetic profile for six adenosine A_{2A} receptor antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2007**, *375*, 133-144.
- (176) Ishiwata, K.; Shimada, J.; Wang, W. F.; Harakawa, H.; Ishii, S.; Kiyosawa, M.; Suzuki, F.; Senda, M. Evaluation of iodinated and brominated [¹¹C]styrylxanthine derivatives as in vivo radioligands mapping adenosine A_{2A} receptor in the central nervous system. *Ann. Nucl. Med.* **2000**, *14*, 247-253.
- (177) Ishiwata, K.; Shimada, J.; Ishii, K.; Suzuki, F. Assessment of adenosine A_{2A} receptors with PET as a new diagnostic tool for neurological disorders. *Drugs Future* **2002**, *27*, 569-576.
- (178) Ishiwata, K.; Noguchi, J.; Wakabayashi, S.; Shimada, J.; Ogi, N.; Nariai, T.; Tanaka, A.; Endo, K.; Suzuki, F.; Senda, M. ¹¹C-labeled KF18446: a potential central nervous system adenosine A_{2A} receptor ligand. *J. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 345-354.
- (179) Wang, W. F.; Ishiwata, K.; Nonaka, H.; Ishii, S.; Kiyosawa, M.; Shimada, J.; Suzuki, F.; Senda, M. Carbon-11-labeled KF21213: a highly selective ligand for mapping CNS adenosine A_{2A} receptors with positron emission tomography. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27*, 541-546.
- (180) Nonaka, H.; Ichimura, M.; Takeda, M.; Nonaka, Y.; Shimada, J.; Suzuki, F.; Yamaguchi, K.; Kase, H. KF17837 ((E)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropyl-7-methylxanthine), a potent and selective adenosine A₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *267*, 335-341.
- (181) Baraldi, P. G.; Manfredini, S.; Simoni, D.; Zappaterra, L.; Zocchi, C.; Dionisotti, S.; Ongini, E. Synthesis of new pyrazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*] pyrimidine and 1,2,3-triazolo[4,5-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*] pyrimidine displaying potent and selective activity as A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2539-2544.
- (182) Todde, S.; Moresco, R. M.; Simonelli, P.; Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Varani, K.; Monopoli, A.; Matarrese, M.; Carpinelli, A.; Magni, F.; Kienle, M. G.; Fazio, F. Design, radiosynthesis, and biodistribution of a new potent and selective ligand for in vivo imaging of the adenosine A_{2A} receptor system using positron emission tomography. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4359-4362.
- (183) Ishiwata, K.; Sakiyama, Y.; Sakiyama, T.; Shimada, J.; Toyama, H.; Oda, K.; Suzuki, F.; Senda, M. Myocardial adenosine A_{2A} receptor imaging of rabbit by PET with [¹¹C]KF17837. *Ann. Nucl. Med.* **1997**, *11*, 219-225.
- (184) Ishiwata, K.; Kawamura, K.; Kimura, Y.; Oda, K.; Ishii, K. Potential of an adenosine A_{2A} receptor antagonist [¹¹C]TMSX for myocardial imaging by positron emission tomography: a first human study. *Ann. Nucl. Med.* **2003**, *17*, 457-462.
- (185) Ishiwata, K.; Mizuno, M.; Kimura, Y.; Kawamura, K.; Oda, K.; Sasaki, T.; Nakamura, Y.; Muraoka, I.; Ishii, K. Potential of [¹¹C]TMSX for the evaluation of adenosine A_{2A} receptors in the skeletal muscle by positron emission tomography. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 949-956.
- (186) Li, A. H.; Moro, S.; Forsyth, N.; Melman, N.; Ji, X. D.; Jacobson, K. A. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacyl-2, 4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 706-721.
- (187) Wadsak, W.; Mien, L. K.; Shanab, K.; Ettlinger, D. E.; Häusler, D.; Sindelar, K.; Lanzenberger, R. R.; Spreitzer, H.; Viernstein, H.; Keppler, B. K.; Dudczak, R.; Kletter,

- K.; Mitterhauser, M. Preparation and first evaluation of [^{18}F]FE@SUPPY: a new PET tracer for the adenosine A_3 receptor. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 61-66.
- (188) Haeusler, D.; Nics, L.; Mien, L. K.; Ungersboeck, J.; Lanzenberger, R. R.; Shanab, K.; Spreitzerf, H.; Sindelar, K. M.; Viernstein, H.; Wagner, K. H.; Dudczak, R.; Kletter, K.; Wadsak, W.; Mitterhauser, M. [^{18}F]FE@SUPPY and [^{18}F]FE@SUPPY:2 - metabolic considerations. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 421-426.
- (189) Melman, A.; Wang, B.; Joshi, B. V.; Gao, Z. G.; Castro, S.; Heller, C. L.; Kim, S. K.; Jeong, L. S.; Jacobson, K. A. Selective A_3 adenosine receptor antagonists derived from nucleosides containing a bicyclo[3.1.0]hexane ring system. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8546-8556.
- (190) Melman, A.; Gao, Z. G.; Kumar, D.; Wan, T. C.; Gizewski, E.; Auchampach, J. A.; Jacobson, K. A. Design of (*N*)-methanocarba adenosine 5'-uronamides as species-independent A_3 receptor-selective agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2813-2819.
- (191) Behrenswerth, A. Adenosin-Rezeptoren und neurodegenerative Erkrankungen: Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und Evaluierung neuer funktionalisierter Liganden als pharmakologische Werkzeuge. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. **2008**.
- (192) Koenigs, W.; Knorr, E. Über einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
- (193) Vorbrüggen, H.; Höfle, G. Nucleoside Syntheses, XXIII) On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1256-1268.
- (194) Heisig, F. Synthese neuer, funktionalisierter BODIPY-Fluorophore zur Fluoreszenzmarkierung von Membranrezeptor-Liganden. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. **2007**.
- (195) Buck, I. M.; Reese, C. B. An unambiguous synthesis of adenylosuccinic acid and its constituent nucleoside. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 2937-2942.
- (196) Hitchings, G. H.; Goodman, I. Verfahren zur Herstellung von 6-Chlor-tri-*O*-acyl- β -D-ribofuranosyl-purin oder seines 2-Aminoderivates. CH Pat. Appl. CH388321A, **1965**.
- (197) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. Protective groups in organic synthesis. Third Edition, John Wiley & Sons, Inc.: **1998**.
- (198) Maeba, I.; Furukawa, H. C-Nucleosides. VI. Synthesis of 5-methoxy-5-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)furan-2-(5*H*)-one and its transformation. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4521-4526.
- (199) Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. Studies on polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C3'-C5' interribonucleotide linkage. Synthesis of uridylyl-(3' \rightarrow 5')-uridine and uridylyl-(3' \rightarrow 5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.
- (200) Brunschweiler, A. Darstellung und Charakterisierung von Uracil- und Adennucleotid-Mimetika als selektive Ectonucleotidase-Inhibitoren. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **2007**.
- (201) Riley, A. M.; Jenkins, D. J.; Marwood, R. D.; Potter, B. V. Synthesis of glucopyranoside-based ligands for D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1067-1082.
- (202) Marwood, R. D.; Riley, A. M.; Jenkins, D. J.; Potter, B. V. L. Synthesis of adenophostin A and congeners modified at glucose. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 1935-1947.
- (203) Bakthavachalam, V.; Lin, L. G.; Cherian, X. M.; Czarnik, A. W. Synthesis, stereochemistry, intramolecular cyclization, and rates of hydrolysis of adenosine 2',3'-acetals. *Carbohydr. Res.* **1987**, *170*, 124-135.
- (204) Le, H. P.; Müller, C. E. Rapid microwave-assisted fluorination yielding novel 5'-deoxy-5'-fluorouridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6139-6142.
- (205) Hartung, J.; Hünig, S.; Kneuer, R.; Schwarz, M.; Wenner, H. 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) - an efficient reagent in the synthesis of alkyl tosylates or sulfenates. *Synthesis* **1997**, *1997*, 1433-1438.

- (206) Edge, M. D.; Jones, A. S. Synthetic analogues of polynucleotides. V. Analogues of trinucleoside diphosphates containing carboxymethylthymidine. *J Chem Soc Perkin 1* **1971**, 10, 1933-1939.
- (207) Hanessian, S.; Huynh, H. K. Formation of 4-alkoxybenzylidene acetals on solid support and generation of functional diversity with carbohydrate scaffolds. *Synlett* **1999**, 102-104.
- (208) Pozsgay, V.; Kubler-Kielb, J. Synthesis of an experimental glycolipoprotein vaccine against lyme disease. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 621-626.
- (209) Takagi, C.; Sakeda, M.; Kim, H. S.; Wataya, Y.; Yabe, S.; Kitade, Y.; Matsuda, A.; Shuto, S. Synthesis of 5'-methylenearisteromycin and its 2-fluoro derivative with potent antimalarial activity due to inhibition of the parasite S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1245-1251.
- (210) Takahashi, H.; Isobe, M.; Goto, T. Chemical synthesis of lampteroflavin as light emitter in the luminous mushroom, lampteromyces-japonicus. *Tetrahedron* **1991**, 47, 6215-6222.
- (211) Zhu, Z.; Buolamwini, J. K. Constrained NBMPR analogue synthesis, pharmacophore mapping and 3D-QSAR modeling of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 3848-3865.
- (212) Bordwell, F. G.; Algrim, D. Nitrogen acids. 1. Carboxamides and sulfonamides. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 2507-2508.
- (213) Römpp CD 2006. Georg Thieme Verlag: **2006**.
- (214) Knutsen, L. J.; Lau, J.; Petersen, H.; Thomsen, C.; Weis, J. U.; Shalmi, M.; Judge, M. E.; Hansen, A. J.; Sheardown, M. J. *N*-Substituted adenosines as novel neuroprotective A₁ agonists with diminished hypotensive effects. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3463-3477.
- (215) Hutchinson, S. A.; Baker, S. P.; Scammells, P. J. New 2,N⁶-disubstituted adenosines: potent and selective A₁ adenosine receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1115-1122.
- (216) Ha, S. B.; Melman, N.; Jacobson, K. A.; Nair, V. New base-altered adenosine analogues: synthesis and affinity at adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 3085-3090.
- (217) Beukers, M. W.; Wanner, M. J.; Von Frijtag Drabbe Künzel, J. K.; Klaasse, E. C.; IJzerman, A. P.; Koomen, G. J. N⁶-Cyclopentyl-2-(3-phenylaminocarbonyltriazene-1-yl)adenosine (TCPA), a very selective agonist with high affinity for the human adenosine A₁ receptor. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1492-1503.
- (218) Klotz, K. N.; Camaioni, E.; Volpini, R.; Kachler, S.; Vittori, S.; Cristalli, G. 2-Substituted *N*-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A₃ adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1999**, 360, 103-108.
- (219) Fink, C. A.; Spada, A. P.; Colussi, D.; Rivera, L.; Merkel, L. Synthesis of a potent A₁ selective adenosine agonist: N⁶-[1-(*R*)-[(3-chloro-2-thienyl)methyl]propyl]adenosine, RG 14718(-). *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **1992**, 11, 1077-1088.
- (220) Martin, P. L. Treatment of heart rhythm disturbances with N⁶-substituted-5'-(*N*-substituted) carboxamidoadenosines. PCT Int. Appl. WO2001037845A1 **2001**.
- (221) Horti, A. G.; Ravert, H. T.; Mathews, W. B.; Abraham, E. H.; Wahl, R. L.; Dannals, R. F. Synthesis of 2-[¹⁸F]fluoroadenosine (2-[¹⁸F]FAD) as potential radiotracer for studying malignancies by PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2006**, 49, 811-815.
- (222) Trivedi, B. K.; Bridges, A. J.; Patt, W. C.; Priebe, S. R.; Bruns, R. F. N⁶-Bicycloalkyladenosines with unusually high potency and selectivity for the adenosine A₁ receptor. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 8-11.
- (223) Robins, M. J.; Basom, G. L. Nucleic acid related compounds. 8. Direct conversion of 2'-deoxyinosine to 6-chloropurine 2'-deoxyriboside and selected 6-substituted deoxynucleosides and their evaluation as substrates of adenosine deaminase. *Can. J. Chem.* **1973**, 51, 3161-3169.
- (224) Elzein, E.; Zablocki, J. A₁ adenosine receptor agonists. US Pat. Appl. US20060009417A1, **2006**.

- (225) Murali, C.; Shashidhar, M. S.; Gopinath, C. S. Hydroxyl group deprotection reactions with $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$: a convenient alternative to hydrogenolysis of benzyl ethers and acid hydrolysis of ketals. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 4149-4155.
- (226) Cousins, R. P. C.; Cox, B.; Eldred, C. D.; Pennell, A. M. K. Preparation of deoxyfluoro nucleosides as adenosine A1 receptors. WO9924449A2, **1999**.
- (227) Rho, J. M. Basic science behind the catastrophic epilepsies. *Epilepsia* **2004**, *45 Suppl 5*, 5-11.
- (228) Wasterlain, C. G.; Baldwin, R.; Naylor, D. E.; Thompson, K. W.; Suchomelova, L.; Niquet, J. Rational polytherapy in the treatment of acute seizures and status epilepticus. *Epilepsia* **2011**, *52 Suppl 8*, 70-71.
- (229) Bordji, K.; Becerril-Ortega, J.; Buisson, A. Synapses, NMDA receptor activity and neuronal A β production in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* **2011**, *22*, 285-294.
- (230) Johnson, K. A.; Conn, P. J.; Niswender, C. M. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2009**, *8*, 475-491.
- (231) Arundine, M.; Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **2003**, *34*, 325-337.
- (232) Dobrek, L.; Thor, P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2011**, *65*, 338-346.
- (233) Die Synthese erfolgte nach einer selbst etablierten Vorschrift.
- (234) Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 597-606.
- (235) Humphrey, G. R.; Kuethe, J. T. Practical methodologies for the synthesis of indoles. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2875-2911.
- (236) de Sa Alves, F. R.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure'. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 782-793.
- (237) Gribble, G. W. Recent developments in indole ring synthesis - methodology and applications. *Contemp. Org. Synth.* **1994**, *1*, 145 - 172.
- (238) Taber, D. F.; Tirunahari, P. K. Indole synthesis: a review and proposed classification. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7195-7210.
- (239) Bartoli, G.; Leardini, R.; Medici, A.; Rosini, G. Reactions of nitroarenes with grignard reagents. General method of synthesis of alkyl-nitroso-substituted bicyclic aromatic systems. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1978**, 692-696.
- (240) Möhlau, R. Über die Einwirkung primärer aromatischer Aminbasen auf Acetophenonbromid. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 171-175.
- (241) Fischer, E.; Jourdan, F. Über die Hydrazine der Brenztraubensäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, *16*, 2241-2245.
- (242) Gassman, P. G.; Van Bergen, T. J.; Gilbert, D. P.; Cue, B. W. General method for the synthesis of indoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5495-5508.
- (243) Hemetsberger, H.; Knittel, D. Synthese und thermolyse von α -azidoacrylestern. *Monatsh. Chem.* **1972**, *103*, 194-204.
- (244) Larock, R. C.; Yum, E. K. Synthesis of indoles via palladium-catalyzed heteroannulation of internal alkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6689-6690.
- (245) Batcho, A. D.; Leimgruber, W. Intermediates for indoles. US Pat. Appl. US3976639A, **1976**.
- (246) Madelung, W. Über eine neue Darstellungsweise für substituierte Indole. I. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 1128-1134.
- (247) Mori, M.; Chiba, K.; Ban, Y. The reactions and syntheses with organometallic compounds. V. A new synthesis of indoles and isoquinolines by intramolecular palladium-catalyzed reactions of aryl halides with olefinic bonds. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1037-1040.

- (248) Nenitzescu, C. D. Derivatives of 2-methyl-5-hydroxyindole. *Bull. Soc. Chim. Romania* **1929**, *11*, 37-43.
- (249) Reissert, A. Einwirkung von Oxalester und Natriumäthylat auf Nitrotoluole. Synthese nitrirter Phenylbrenztraubensäuren. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 1030-1053.
- (250) Sundberg, R. J.; Russell, H. F.; Ligon, W. V., Jr.; Lin, L.-S. *o*-Styrylnitrene route to 2-substituted indoles. pyrolysis of *o*-azidostyrenes. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 719-724.
- (251) Hayakawa, K.; Yasukouchi, T.; Kanematsu, K. A new approach to the efficient indole synthesis by allene intramolecular cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1837-1840.
- (252) Salituro, F. G.; Harrison, B. L.; Baron, B. M.; Nyce, P. L.; Stewart, K. T.; Kehne, J. H.; White, H. S.; McDonald, I. A. 3-(2-Carboxyindol-3-yl)propionic acid-based antagonists of the N-methyl-D-aspartic acid receptor associated glycine binding-site. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1791-1799.
- (253) Bigge, C. F.; Graham, J.; Po-Wai, Y. Derivatives of 2-carboxyindoles having pharmaceutical activity. US Pat. Appl. US5284862, **1994**.
- (254) Poriel, C.; Lachia, M.; Wilson, C.; Davies, J. R.; Moody, C. J. Oxidative rearrangement of indoles: a new approach to the EFHG-tetracyclic core of diazonamide A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2978-2987.
- (255) Watson, T. J. N.; Horgan, S. W.; Shah, R. S.; Farr, R. A.; Schnettler, R. A.; Nevill, C. R.; Weiberth, F. J.; Huber, E. W.; Baron, B. M.; Webster, M. E.; Mishra, R. K.; Harrison, B. L.; Nyce, P. L.; Rand, C. L.; Goralski, C. T. Chemical development of MDL 103371: an N-methyl-D-aspartate-type glycine receptor antagonist for the treatment of stroke. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 477-487.
- (256) Vara, Y.; Aldaba, E.; Arrieta, A.; Pizarro, J. L.; Arriortua, M. I.; Cossio, F. P. Regiochemistry of the microwave-assisted reaction between aromatic amines and α -bromo-ketones to yield substituted 1*H*-indoles. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1763-1772.
- (257) Gray, N. M.; Dappen, M. S.; Cheng, B. K.; Cordi, A. A.; Biesterfeldt, J. P.; Hood, W. F.; Monahan, J. B. Novel indole-2-carboxylates as ligands for the strychnine-insensitive N-methyl-D-aspartate-linked glycine receptor. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1283-1292.
- (258) Mérour, J. Y.; Cossais, F. Regioselective *N*-alkylation of methyl indole-2-carboxylate. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1813 - 1820.
- (259) Inahashi, N.; Matsumiya, A.; Sato, T. Efficient *N*-*tert*-butoxycarbonylation of indoles with di-*tert*-butyl dicarbonate catalyzed by cesium fluoride. *Synlett* **2008**, 294-296.
- (260) Baron, B. M.; Cregge, R. J.; Farr, R. A.; Friedrich, D.; Gross, R. S.; Harrison, B. L.; Janowick, D. A.; Matthews, D.; McCloskey, T. C.; Meikrantz, S.; Nyce, P. L.; Vaz, R.; Metz, W. A. CoMFA, synthesis, and pharmacological evaluation of (*E*)-3-(2-carboxy-2-arylvinyl)-4,6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acids: 3-[2-(3-aminophenyl)-2-carboxyvinyl]-4,6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acid, a potent selective glycine-site NMDA receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 995-1018.
- (261) Kiéc-Kononowicz, K.; Cegla, M. T. Theophylline derivatives as potential histamine H₃-receptor antagonists. *Pharmazie* **1998**, *53*, 518-521.
- (262) Müller, C. E. Adenosinrezeptor-Antagonisten: Synthese, in-vitro Testung, Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Habilitationsschrift. Universität Tübingen **1994**.
- (263) Brederick, H.; Föhlisch, B.; Siegel, E. Synthesen in der Purinreihe. XIII. Über die Darstellung einiger Xanthin-Aldehyde-(8). *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 403-413.
- (264) Baraldi, P. G.; Nasser, A. Z.; Fruttarolo, F.; Tabrizi, M. A.; Nunez, M. C.; Spalluto, G.; Romagnoli, R. A synthetic approach for the preparation of rigid analogs of 1,3-dipropyl-7-methyl-8-aryl/heteroarylstyryl xanthines. *Synthesis* **2001**, 773-777.
- (265) Müller, C. E.; Sauer, R.; Geis, U.; Frobenius, W.; Talik, P.; Pawlowski, M. Aza-Analogs of 8-Styrylxanthines as A_{2A}-Adenosine Receptor Antagonists. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1997**, *330*, 181-189.
- (266) Sauer, R. Neue Purin- und Pyrimidin-Rezeptorliganden: Synthese, Stabilitätsuntersuchungen und Entwicklung chromatographischer Reinigungsmethoden. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. **2000**.

- (267) Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Morel, A. F.; Costa, C. C.; Lima, M. G. The solvent free preparation of β -amino esters α,β -unsaturated ketones and esters with domestic microwave oven. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 184-188.
- (268) Elsinghorst, P. W. Dual-mode cholinesterase inhibitors targeting muscarinic receptors. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn. **2007**.
- (269) Erndt, A.; Para, A.; Kostuch, A.; Fiedorowicz, M. Photochemistry of purine systems, IV photoreactions of theophylline with ethers in the presence of aliphatic ketones. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, *1985*, 937-943.
- (270) Siméon, F. G.; Brown, A. K.; Zoghbi, S. S.; Patterson, V. M.; Innis, R. B.; Pike, V. W. Synthesis and Simple ^{18}F -Labeling of 3-Fluoro-5-(2-(2-(fluoromethyl)thiazol-4-yl)ethynyl)benzonitrile as a High Affinity Radioligand for Imaging Monkey Brain Metabotropic Glutamate Subtype-5 Receptors with Positron Emission Tomography. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3256-3266.
- (271) Ikehara, M. Coenzyme analogs. II. a convenient synthesis of thioinosine. *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 367-368.
- (272) Prystas, M.; Sorm, F. Nucleic acid components and their analogs. LXXV. Synthesis of 6-furfurylthionebularine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31*, 1028-1034.
- (273) Zhao, H.; Pagano, A. R.; Wang, W. M.; Shallop, A.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. Use of a ^{13}C -atom to differentiate two ^{15}N -labeled nucleosides. Syntheses of [$^{15}\text{NH}_2$]-adenosine, [1, NH_2 - $^{15}\text{N}_2$]- and [2- ^{13}C -1, NH_2 - $^{15}\text{N}_2$]-guanosine, and [1,7, NH_2 - $^{15}\text{N}_3$]- and [2- ^{13}C -1,7, NH_2 - $^{15}\text{N}_3$]-2'-deoxyguanosine. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7832-7835.
- (274) Yadav, V.; Chu, C. K.; Rais, R. H.; Al, S. O. N.; Guarcello, V.; Naguib, F. N. M.; El, K. M. H. Synthesis, biological activity and molecular modeling of 6-benzylthioinosine analogs as subversive substrates of *toxoplasma gondii* adenosine kinase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1987-1996.
- (275) Ottria, R.; Casati, S.; Baldoli, E.; Maier, J. A. M.; Ciuffreda, P. N^6 -Alkyladenosines: synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8396-8402.
- (276) Chladek, S.; Smrt, J. Oligonucleotidic compounds. V. 2',3'-O-alkylidene derivatives of ribonucleosides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1963**, *28*, 1301-1308.
- (277) Morley, C. G.; Hogenkamp, H. P. Improvements in the partial synthesis of 5'-deoxyadenosylcobalamin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *123*, 207-208.
- (278) Carlin, R. B.; Forshey, W. O. The benzidine rearrangement. II. The rearrangements of three 3,3',5,5'-tetrasubstituted hydrazobenzenes in 2:1 sulfuric acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 793-801.
- (279) Wautelet, P.; Le Moigne, J.; Videva, V.; Turek, P. Spin exchange interaction through phenylene-ethynylene bridge in diradicals based on iminonitroxide and nitronyl nitroxide radical derivatives. I. Experimental investigation of the through-bond spin exchange coupling. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8025-8036.
- (280) Onitsuka, K.; Fujimoto, M.; Kitajima, H.; Ohshiro, N.; Takei, F.; Takahashi, S. Convergent synthesis of platinum-acetylide dendrimers. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 6433-6446.
- (281) Kubiczak, G. A.; Oesch, F.; Borlakoglu, J. T.; Kunz, H.; Robertson, L. W. A unique approach to the synthesis of 2,3,4,5-substituted polybrominated biphenyls - quantitation in firemaster Ff-1 and firemaster Bp-6. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1160-1164.
- (282) Ishii, H.; Murakami, Y.; Takeda, H.; Furuse, T. Fischer indolization and its related compounds. VIII. Formation of 4-aminoindole derivatives on the Fischer indolization of 2-methoxyphenylhydrazones derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 1981-1989.
- (283) La, R. G.; Coluccia, A.; Piscitelli, F.; Bergamini, A.; Sinistro, A.; Cavazza, A.; Maga, G.; Samuele, A.; Zanolli, S.; Novellino, E.; Artico, M.; Silvestri, R. Indolyl aryl sulfones as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: role of two halogen atoms at the indole ring in developing new analogues with improved antiviral activity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5034-5038.
- (284) Feofilaktov, V. V. Action of aromatic diazo compounds on compounds of the alkyl-acetoacetic ester type as a method of preparation of arylhydrazones of α -keto acids, α -

- amino acids, and indole derivatives. X. Reaction of the ester of cyclopentanone-carboxylic acid with diazobenzene and 1-diazonaphthalene. *Zh. Obshch. Khim.* **1947**, *17*, 993-1004.
- (285) Salituro, F. G.; Harrison, B. L.; Baron, B. M.; Nyce, P. L.; Stewart, K. T.; McDonald, I. A. 3-(2-Carboxyindol-3-yl)propionic Acid Derivatives: Antagonists of the Strychnine-insensitive Glycine Receptor Associated with the *N*-Methyl-D-Aspartate Receptor Complex. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2944-2946.
- (286) Santagada, V.; Frecentese, F.; Perissutti, E.; Fiorino, F.; Severino, B.; Cirillo, D.; Terracciano, S.; Caliendo, G. Efficient Microwave Combinatorial Parallel and Non-parallel Synthesis of *N*-Alkylated Glycine Methyl Esters as Peptide Building Blocks. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 618-621.
- (287) Sanchez, J. D.; Ramos, M. T.; Avendano, C. Synthesis of 5-*N*-acetylardeemin *seco*-analogues. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 969-980.
- (288) Manske, R. H. F. Synthesis of some indole derivatives. *Can. J. Res.* **1931**, *4*, 591-595.
- (289) Thi, A. N. T.; Lamant, M. Synthesis starting from 2-cyanocyclopentanone. Application of arylhydrazones of 5-cyano-5-oxopentanoic acid to the preparation of indole derivatives. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1987**, 361-364.
- (290) Wright, S. W.; Carlo, A. A.; Danley, D. E.; Hageman, D. L.; Karam, G. A.; Mansour, M. N.; McClure, L. D.; Pandit, J.; Schulte, G. K.; Treadway, J. L.; Wang, I.-K.; Bauer, P. H. 3-(2-Carboxy-ethyl)-4,6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acid: an allosteric inhibitor of fructose-1,6-bisphosphatase at the AMP site. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2055-2058.
- (291) Bigge, C. F.; Johnson, G.; Yuen, P. W. 4,6-dichloro-2-carboxy-*N*-(phenylsulfonyl)-1*H*-indole-3-alkanoic acids, a method for their preparation and their use as glutamergic or aspartergic neurotransmitter antagonists. US Pat. Appl. WO9216205A2, **1992**.
- (292) Kalla, R. V.; Elzein, E.; Perry, T.; Li, X.; Palle, V.; Varkhedkar, V.; Gimbel, A.; Maa, T.; Zeng, D.; Zablocki, J. Novel 1,3-disubstituted 8-(1-benzyl-1*H*-pyrazol-4-yl) xanthines: high affinity and selective A_{2B} adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3682-3692.
- (293) Blicke, F. F.; Godt, H. C., Jr. Reactions of 1,3-dimethyl-5,6-diaminouracil. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2798-2800.
- (294) Goldner, H.; Dietz, G.; Carstens, E. A new synthesis of xanthine derivatives. *Naturwissenschaften* **1964**, *51*, 137.
- (295) Cacace, F.; Fabrizi, G.; Zifferero, M. Derivatives of 7-theophyllinecarboxylic, -acetic, and -propionic acids. *Ann. Chim.* **1955**, *45*, 983-993.
- (296) Goldner, H.; Dietz, G.; Carstens, E. Reaktionen Mit Nitrosouracilderivaten. I. Eine Neue Xanthin-Synthese. *Liebigs Ann. Chem.* **1966**, *691*, 142-158.
- (297) Goldner, H.; Dietz, G.; Carstens, E. Xanthine derivatives. GB982079, **1965**.

9 DANKESCHÖN!

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nur ein Traum geblieben. All denen möchte ich auf diesem Weg meinen besonderen Dank ausdrücken.

Zuerst möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Christa E. Müller für die Chance zur Promotion, ihre Geduld, ihre wertvollen Anregungen und die zahlreichen Diskussionen danken. Die Zeit in Deinem Arbeitskreis war für mich eine große Herausforderung und Bereicherung.

Prof. Dr. Evi Kostenis bin ich sehr dankbar für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit verdanke ich dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. Im Rahmen dieses Stipendiums habe ich außerdem viele nette Menschen kennengelernt und viel Spaß bei gemeinsamen Veranstaltungen gehabt. Besonders danken möchte ich dem Organisationsteam des Promovierendentreffens "Anfang ist...", vor allem Jonas Angstenberger, ohne den ich bei der Organisation des Promotionstreffens wohl wahnsinnig geworden wäre. Außerdem danke ich den Mitgliedern des Graduiertenkolleg 677 („Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“) für die vielen spannenden Vorträge und Workshops. Der Austausch mit Euch war immer sehr lehrreich und der Blick über den Tellerrand hat sehr gut getan.

Zum Gelingen der Synthesen haben viele freundliche Kollegen beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Joachim Burbiel, Dr. Jörg Hockemeyer und Hamid Radjainia, mit denen ich zu Anfang meiner Promotion in einem Labor arbeiten durfte und die mir auch nach dieser Zeit häufig mit Rat und Tat zur Seite standen. Außerdem danke ich Dr. Nikolay Tzvetkov, der mir hin und wieder einen Ausweg aus kleineren und größeren Problemen zeigen konnte.

Sabine Terhart-Krabbe, Annette Reiner, Marion Schneider, Frank Umbach und Hermann Passgang danke ich für die Analytik meiner Verbindungen und ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft. Im Rahmen des GPR17-Projektes danke ich Dr. Andreas Spinrath und Dr. Aliaa Abdelrahman für die Testung meiner Verbindungen in funktionellen Assays und die Bereitstellung der Daten.

Meinen "Korrekturlesern" Dr. Melanie Knospe, Dr. Daniela Bertarelli und Dr. Jörg Ritter danke ich für ihre wirklich gute Arbeit und die vielen Kommata.

Herrn Prof. Dr. Bendas, Dr. Anke Schiedel und den Assistenten des 1. Semesters möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre bei der Betreuung der Studenten danken. Vor allem mit Astrid Hartung und Ali El Tayeb hatte ich viele sehr nette und lustige Aufsichten. Michaela Borrmann und Astrid Hartung möchte ich zusätzlich für ihr großes Engagement im Praktikum danken. Auf Euch war wirklich immer Verlass.

Die schöne Zeit, die ich in der Pharmazie verbringen durfte, verdanke ich besonders auch meinen Bürokollegen Petra, Daniela, Sonja, Melanie, Svenja, Meryem, Minka, Stephan, Stefanie und Angelika. Mit meinen Kollegen Petra Hillmann, Andrea Behrenswerth, Daniela Bertarelli sowie Melanie Knospe habe ich während meiner Promotion auch viele schöne Abende verbringen dürfen. Danke für diese tolle Zeit.

Liebe Melanie, Dir möchte ich besonders auch für dein großes Engagement bei meiner Hochzeit, die vielen schönen Fleißsterne und die lustigen Tänze im Labor danken. Wenn man bei anhaltend schlechter Laune ein Blümchen aus Labormaterialien im Labor findet oder der Schreibtisch übers Wochenende farbenfroh umdekoriert worden war, bestand nie ein Zweifel, dass nur eine liebe Freundin wie Du auf diesen Einfall gekommen sein konnte!

Meiner Freundin Britta danke ich besonders für Ihre langjährige Freundschaft. Auch wenn wir es nicht immer schaffen, einen passenden Termin zu finden, so ist unsere Freundschaft seit der 7. Klasse nie eingebrochen. Ich hoffe, dies wird sich niemals ändern!

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie. Meine Eltern Sigrid und Harald waren immer davon überzeugt, dass man alles erreichen kann, wenn man es nur genug will. Durch ihre Liebe und Unterstützung bin ich überhaupt erst soweit gekommen, dass ich mich für eine Promotion entscheiden konnte. Meiner Schwester Marina und ihrem Mann Rainer danke ich auch für die vielen aufmunternden Telefonate und die „Synthese“ meiner bezaubernden, kleinen Nichte Emilia. Meinen Schwiegereltern Heidi und Gerhard und meinem Schwager Michael bin ich für Ihre Unterstützung und ihre wundervoll ruhige Art, die eine schöne Ergänzung zu meiner turbulenten Familie bildet, dankbar.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Jörg für die 14 wundervollsten Jahre danken, die ein Mensch erleben kann. Ich habe in meiner Promotion oft genug den Glauben an mich selbst verloren, Danke, dass Du dies nie getan hast. Ich liebe Dich für die vielen „Alles wird gut“ und „Kopf hoch“ aber genauso für all die „Reiß dich zusammen!“ und „Streng Dich an!“. Durch Deine unerschütterliche Liebe hältst du mein Leben in Waage. Danke!

10 ANHANG

Tabelle 10-1: EC₅₀ und maximaler Effekt ausgewählter GPR17-Agonisten in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen bestimmt im IP₃-Assay; Tabelle modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Verb.	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ± SEM [μM]	max. Effekt ± SEM bei 100 μM Verbindung ^a
98	H	Cl	Cl	0.67 ± 0.27	100 (10 μM Verbindung)
111	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	Cl	9.15 ± 0.36	95 ± 1
123	H	CH ₃	CH ₃	23.4 ± 4.9	85 ± 5
129	H	H	Cl	5.34 ± 0.78	95 ± 7
148	H	F	F	21.9 ± 8.4	84 ± 2

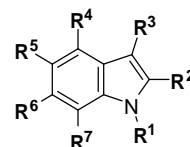
^aDer maximale Effekt ist angegeben für 100 μM Verbindung und bezogen auf 10 μM der Leitstruktur (**98**) (n = 3 – 5).

Tabelle 10-2: EC₅₀ und maximaler Effekt ausgewählter GPR17-Agonisten bestimmt im DMR-Assay (n = 3 – 6); Tabelle modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴

Verb.	R ¹	R ²	R ³	1321N1-GPR17- Zellen		CHO-GPR17-Zellen	
				EC ₅₀ ± SEM [μM]	max. Effekt ± SEM bei 100 μM Verbindung ^a	EC ₅₀ ± SEM [μM]	max. Effekt ± SEM bei 100 μM Verbindung ^b
98	H	Cl	Cl	0.43 ± 0.11	100	0.03 ± 0.01	100
111	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	Cl	n. d.	n. d.	2.06 ± 0.62	64 ± 10
123	H	CH ₃	CH ₃	n. d.	n. d.	3.16 ± 1.23	77 ± 4
129	H	H	Cl	2.46 ± 0.88	85 ± 7	0.29 ± 0.08	72 ± 10
148	H	F	F	n. d.	n. d.	9.33 ± 10.50	63 ± 7

^aDer maximale Effekt in rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen ist angegeben für 100 μM Verbindung und bezogen auf 30 μM der Leitstruktur (**98**). ^bDer maximale Effekt in rekombinanten CHO-GPR17-Zellen ist angegeben für 100 μM Verbindung und bezogen auf 10 μM der Leitstruktur (**98**).

Tabelle 10-3: Bestimmung der Potenz und des maximalen Effekts von RA-II-150 (98) und verwandten Indolderivaten durch Messung der intrazellulären Freisetzung von Calcium; Tabelle modifiziert nach Spinrath.¹⁴⁴



Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17- Zellen ^a	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in rekombinanten Zellen ^b	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in nativen Zellen ^c
98	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	H	Cl	H	1.08 ± 0.16 / 0.0084 ± 0.0015	100 / 100 (bei 0.3 μM)	-1 ± 2/ 0 ± 1 (bei 0.1 μM)
107	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
108	CH ₃	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
109	CH ₃	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	H	Cl	H	> 30 μM / 9.59 ± 2.18	16 ± 4/ 55 ± 4	-4 ± 2/ 1 ± 4
110	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
111	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	H	Cl	H	5.44 ± 0.94 / 0.20 ± 0.06	80 ± 6 / 85 ± 5 (bei 1 μM)	1 ± 1 / 1 ± 1 (bei 1 μM)

Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17- Zellen ^a	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in rekombinanten Zellen ^b	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in nativen Zellen ^c
112	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	H	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
113	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	H	H	H	> 30 μM / 17.9 ± 4.3	8 ± 2 / 64 ± 10	n. a. / 7 ± 5
114	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	Cl	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
115	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	Cl	H	H	> 30 μM / > 30 μM	11 ± 2 / 12 ± 1	-3 ± 1 / 4 ± 1
116	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	CH(CH ₃) ₂	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
117	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	CH(CH ₃) ₂	H	H	> 30 μM / > 30 μM	6 ± 2 / 7 ± 6	n. a. / 1 ± 2
118	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	F	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
119	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	F	H	H	> 30 μM / > 30 μM	9 ± 6 / 11 ± 7	n. a. / 2 ± 4
120	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	OCH ₃	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
121	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	OCH ₃	H	H	> 30 μM / > 30 μM	5 ± 3 / 7 ± 4	n. a. / 1 ± 3

Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17- Zellen ^a	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in rekombinanten Zellen ^b	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in nativen Zellen ^c
122	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	CH ₃	H	CH ₃	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
123	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CH ₃	H	CH ₃	H	15.1 ± 3.8 / 0.36 ± 0.04	76 ± 6 / 68 ± 2 (bei 1 μM)	1 ± 1 / 1 ± 1 (bei 1 μM)
124	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Cl	Cl	H	Cl	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
125	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	Cl	H	Cl	> 30 μM / > 30 μM	16 ± 12 / 1 ± 1	1 ± 2 / 3 ± 2
126	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	Cl	Cl	H	> 30 μM / > 30 μM	11 ± 8 / 6 ± 2	1 ± 2 / 4 ± 2
127	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
128	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Cl	H	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
129	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	H	Cl	H	5.19 ± 1.55 / 0.024 ± 0.005	84 ± 6 / 94 ± 7 (bei 1 μM)	4 ± 3 / 1 ± 2 (bei 0.3 μM)
130	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	H	H	H	> 30 μM / 12.6 ± 5.0	52 ± 16 / 68 ± 5	2 ± 1 / 4 ± 1

Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17- Zellen ^a	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in rekombinanten Zellen ^b	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in nativen Zellen ^c
137	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	H	H	Cl	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
138	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Cl	H	H	Cl	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
139	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	H	H	Cl	> 30 μM / 20.7 ± 8.1 ^e	-5 ± 3 / 21 ± 7	n. a. / 4 ± 1
140	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Cl	H	H	Cl	> 30 μM / 11.4 ± 3.1	1 ± 1 / 38 ± 6	n. a. / 1 ± 1
143	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	H	benzo[g]		n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
144	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	H	benzo[g]		> 30 μM / 18.1 ± 6.9	0 ± 2 / 61 ± 10	n. a. / 1 ± 2
147	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	F	H	F	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
148	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	F	H	F	H	8.10 ± 2.26 / 0.17 ± 0.04	77 ± 2 / 97 ± 5 (bei 3 μM)	2 ± 1 / 1 ± 2 (bei 3 μM)
151	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	CF ₃	H	H	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
173	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	Br	H	Br	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d

Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17- Zellen ^a	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in rekombinanten Zellen ^b	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in nativen Zellen ^c
174	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	Br	H	Br	H	0.195 ± 0.006 / 0.015 ± 0.004	106 ± 1 (bei 10 μM) / 89 ± 1 (bei 0.3 μM)	0 ± 1 / 0 ± 0 (bei 0.3 μM)
195	H	CO ₂ Et	(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
196	H	CO ₂ H	(CH ₂) ₃ CO ₂ H	Cl	H	Cl	H	> 30 μM / > 30 μM	1 ± 1 / 27 ± 9	n. a. / 1 ± 3
199	H	CO ₂ Et	H	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
200	H	CO ₂ H	H	Cl	H	Cl	H	> 30 μM / > 30 μM	1 ± 1 / 4 ± 2	n. a. / 3 ± 1
204	CHCO ₂ Et	CO ₂ Et	H	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
205	CHCO ₂ H	CO ₂ H	H	Cl	H	Cl	H	> 30 μM / > 30 μM	0 ± 0 / 2 ± 1	n. a. / n. a.
209	H	CO ₂ Et	(CH) ₂ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
210	H	CO ₂ Et	CHO	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d

Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	EC ₅₀ ± SEM [μM] 1321N1-GPR17- / CHO-GPR17- Zellen ^a	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in rekombinanten Zellen ^b	max. Effekt ± SEM (bei 30 μM) in nativen Zellen ^c
212	H	CO ₂ H	(CH) ₂ CO ₂ H	Cl	H	Cl	H	> 30 μM / 1.59 ± 0.34	22 ± 4 / 92 ± 1	-2 ± 1 / 0 ± 2
217	H	CO ₂ Et	CH ₂ NHCH ₂ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d
218	H	CO ₂ H	CH ₂ NHCH ₂ CO ₂ Et	Cl	H	Cl	H	> 30 μM / > 30 μM	13 ± 0 / 8 ± 2	n. d. / n. d.
221	H	CO ₂ Et	H	H	Cl	H	Cl	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d	n. d. / n. d. ^d

^aBestimmt wurden die EC₅₀-Werte der Verbindungen an rekombinanten 1321N1-GPR17-Zellen und an rekombinanten CHO-GPR17-Zellen. ^bDie Daten von 30 μM der jeweiligen Verbindung in rekombinanten 1321N1-Zellen bzw. CHO-Zellen wurden normiert auf die Werte von 30 μM RA-II-150 (**98**) in 1321N1-Zellen bzw. 0,3 μM RA-II-150 (**98**) in CHO-Zellen. ^cUnspezifische Effekte wurden an nativen 1321N1-Zellen bzw. CHO-K1-Zellen bestimmt. Die Daten von 30 μM der jeweiligen Verbindung wurden auf die Werte von 100 μM Carbachol in 1321N1-Zellen bzw. 100 μM ATP in CHO-K1-Zellen (n = 3-4) normiert. Inaktive Verbindungen wurden nicht an nativen Zellen getestet (n. a.). ^dohne Säurefunktion und somit wahrscheinlich inaktiv. ^eDer EC₅₀ von Verbindung **139** wurde nach Extrapolation berechnet, da eine Sättigung der Dosis-Wirkungs-Kurve bis zu einer Konzentration von 100 μM nicht erreicht werden konnte.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn, den

Kirsten Ritter